



Etudes structurale et fonctionnelle de protéines impliquées dans la virulence chez *S. pneumoniae* et *P. aeruginosa*

Thierry Izoré

► To cite this version:

Thierry Izoré. Etudes structurale et fonctionnelle de protéines impliquées dans la virulence chez *S. pneumoniae* et *P. aeruginosa*. Biologie structurale [q-bio.BM]. Université de Grenoble, 2011. Français. NNT : 2011GRENV047 . tel-00638763

HAL Id: tel-00638763

<https://theses.hal.science/tel-00638763>

Submitted on 7 Nov 2011

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Biochimie et Biologie Structurale**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Thierry IZORÉ

Thèse dirigée par **Andréa DESSEN**

préparée au sein du **L'institut de Biologie Structurale JP. EBEL**
dans l'**École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

Études Structurale et Fonctionnelle de protéines impliquées dans la virulence chez *S. pneumoniae* et *P. aeruginosa*

Thèse soutenue publiquement le **10 Octobre 2011**,
devant le jury composé de :

Mme Patricia RENESTO

Dr à l'UVHCI, Grenoble, (Examinatrice et Présidente)

Mme Andréa DESSEN

Dr à l'Institut de Biologie Structurale, Grenoble, (Examinatrice)

Mr Gurvan MICHEL

Dr à la Station Biologique de Roscoff, Roscoff, (Rapporteur)

MR Romé VOULHOUX

Dr au Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Macromoléculaires, Marseille,
(Rapporteur)



Résumé

Cette thèse est composée de deux parties :

La première partie rend compte de l'étude structurale de la protéine RrgA. RrgA est associée au pilus du pathogène *Streptococcus pneumoniae* et participe aux premières étapes de colonisation chez l'hôte en se liant à plusieurs composants de la Matrice Extra Cellulaire. Nous avons résolu la structure de cette protéine à 1.9 Å par cristallographie aux rayons-X. RrgA possède une structure allongée formée de quatre domaines alignés d'origine eucaryote et procaryote. En effet, trois domaines ayant des similarités structurales avec les IgG et le domaine Cna-B semblent servir de piédestal pour orienter et présenter le domaine fonctionnel de type Intégrine. Nous avons confirmé la formation de deux ponts isopeptidiques stabilisateurs par spectrométrie de masse. De plus, le domaine intégrine possède deux insertions particulières dont la présence pourrait être impliquée dans la reconnaissance des divers substrats par RrgA.

La deuxième partie de cette thèse est axée sur l'étude structurale du complexe ATPase et de ExsB, la pilotine présumée du système de sécrétion de type III chez *Pseudomonas aeruginosa*, bactérie opportuniste et jouant un rôle majeur dans l'infection des patients atteints de mucoviscidose. Pour la première fois, nous avons mis au point un protocole d'expression et de purification sous forme soluble de l'ATPase PscN en complexe avec une protéine partenaire, PscL. Des cristaux de ce complexe ont été obtenus au robot du PSB. Par ailleurs, nous avons confirmé l'expression de la lipoprotéine ExsB chez *P. aeruginosa* que nous avons localisée au sein de la membrane externe. De plus, nous avons résolu la structure de cette protéine qui présente un nouveau repliement et qui établit les bases structurales pour l'étude des pilotines pour tous les systèmes de sécrétion de type III de la famille Ysc.

Abstract

This manuscript is made up of two parts

The first part describes the structural study of RrgA from *Streptococcus pneumoniae*. This protein is a pilus-associated adhesin that is able to bind to several components of the Extra Cellular Matrix and thus, participates in the first steps of host colonization. We solved the structure of RrgA to 1.9 Å by X-Ray crystallography. We showed that RrgA folds into an elongated 4-domain structure, and these domains display both eukaryotic and prokaryotic origins. Actually, three out of the four domains are reminiscent of IgG and Cna-B structures and act like stalks to orient and display the large Integrin-like domain. We confirmed the presence of two isopeptide bonds by mass spectrometry and hypothesised that the two inserted arms in the integrin domain could explain the wide variety of substrates RrgA can bind.

The second part of this manuscript focuses on the structural studies of the ATPase complex as well as ExsB, the putative pilotin of the type III secretion system from *Pseudomonas aeruginosa*. This bacterium is a major threat in hospital-acquired infections and the main pathogen found in cystic-fibrosis suffering patients. For the first time we were able to express and purify the ATPase PscN in complex with its partner PscL. Crystallization trials led to a very promising condition that is being refined. Moreover, we confirmed expression of the lipoprotein ExsB in *P. aeruginosa* that we localised in the outer membrane. To have a better understanding of this protein, we also solved its high-resolution structure that displays a novel fold and our study paves the way for coming studies concerning pilotins.

Keywords : *Pseudomonas aeruginosa*, Type III Secretion System, X-ray crystallography, *Streptococcus pneumoniae*, Pilus, Adhesin.

REMERCIEMENTS

Au cours de mes trois ans de thèse passés au sein du Groupe de Pathogénie Bactérienne à l'IBS, il m'a été donné de rencontrer des personnes possédant de grandes qualités aussi bien scientifiques qu'humaines.

En premier lieu, je souhaiterais remercier Andréa Dessen, directrice scientifique du groupe. Tu m'as accompagné tout au long de ces années m'accordant ainsi ta confiance et ton amitié. Toujours présente, tu as su me donner les bons conseils pour avancer. Je suis aujourd'hui honoré d'avoir eu la chance d'effectuer ma thèse sous ta direction. Merci pour tout.

Viviana, merci pour le temps passé à discuter des différents projets que nous avons en commun, à râler après PscN et PscC et aussi et surtout pour ton aide en Biologie Moléculaire. Au delà de la science, je me souviendrai de ton incroyable tiramisu et de tes prouesses à la Wii ☺.

Carlos, LE cristallographe du groupe... Sans toi, RrgA ne serait encore qu'un gros « plat de spaghetti » alors, un grand merci. Merci d'avoir pris le temps de m'épauler dans mon apprentissage de la cristallographie et d'avoir répondu à 10 questions par minute au moment où je rédigeais cette thèse.

Clothilde, un très grand merci. Maître de stage de M2, tu as toi aussi passé beaucoup de temps à m'apprendre comment purifier une « prot » et comment la faire cristalliser. Si au niveau scientifique tu m'as beaucoup apporté, je te remercie aussi pour ton amitié.

Merci aux personnes ayant partagé mon bureau pendant ces trois ans. Alex biensûr, fidèle au poste, puis tour à tour PJ, Gaëlle et enfin Julia... Quelques fous rires, d'innombrables boîtes de bonbons mais aussi une atmosphère studieuse quand il le fallait ☺. Pj, on attend toujours de participer à une de tes auditions !!!

Un grand merci à David dit « Jr. Boss » pour son amitié et sa bonne humeur constante et sans faille au labo. Merci aussi à toutes les personnes qui sont restées plus ou moins longtemps dans l'équipe : Gaëlle (merci pour les cristaux ☺), Tiffen, Camille, Jérôme, Sandy, Tommaso, Karen et ceux que j'oublie certainement.

Enfin, merci à tous nos collaborateurs : Ina, Eric, Caro pour les manips sur « Pseudo » et Anne-Marie, Thierry Vernet, Lamya pour celles sur « Pneumo ».

Pour conclure, un immense merci à ma famille dont le soutien et les encouragements ont été des moteurs essentiels pour moi : Maman, Papa, Mathieu, Cyril, Kiki, Merci !

Liste des abréviations

°C : degré centigrade

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADPRT : ADP Ribosyl Transférase

AMP : Adenosine Mono Phosphate

ARN : Acide Ribonucléique

C12E8 : Polyoxyethylene dodecyl ether / 3,6,9,12,15,18,21,24-octaoxahexatriacontan-1-ol

CBP : Choline-Binding Proteins

CHAPS : 3-[(3-Cholamidopropyl)-Diméthylammonio]-1-Propane Sulfonate

CFTR : Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator

CNRP : Centre National de Référence du Pneumocoque

CWSS : Cell Wall Sorting Signal

Da : Dalton

DDM : n-Dodécyl- β -D-Maltopyranoside

DO : Densité Optique

EARSS : European Antimicrobial Resistance Surveillance Network

Fc : Fragment commun des Ig

GAP : GTPase activating Protein

GST : Glutathion-S-Transférase

GTP : Guanosine Tri Phosphate

HTXlab : High Throughput Crystallisation lab

Ig : Immunoglobuline

INVS : Institut National de Veille Sanitaire

IPTG : Isopropyl β -D-thiogalactopyranoside

LAPAO : 3-Dodecylamido-N,N'-diméthylpropyl amine oxyde

LB : Luria-Bertani Broth

LDAO : Lauryldiméthylamine-N-oxide

MAD : Multiple-wavelength Anomalous Diffraction

MBP : Maltose Binding Protein

MES : 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid

MSCRAMM : Microbial Surface Component Recognising Adhesive Matrix Molecules

OMS : Organisation mondiale de la santé
PCR : Polymerase Chain Reaction
PDB : Protein Data Bank
PEG : Poly-Ethylene-Glycol
PI-I : Pathogenicity Islet I
PMSF : Phenylmethanesulfonylfluoride
PSB : Partnership for Structural Biology
Rlr : Rof-like regulator
Rrg : Rof-like regulated gene
rpm : rotations par minute
SAD : Single-wavelength Anomalous Diffraction
SDS : Sodium Dodécyl Sulfate
SOD : Superoxide Dismutase
Srt : Sortase
T2SS : Système de sécrétion de type II
T3SS : Système de Sécrétion de Type III
T4bSS : Système de sécrétion de type IVb
TB : Terrific Broth
TEV : Tobacco Etch Virus
T_m : Température de fusion
TM : TransMembrane
TPR : TetratricoPeptide Repeat
Tris : Trishydroxyméthylaminométhane
TSA : Thermal Shift Assay
UA : Unité Arbitraire
VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

SOMMAIRE

Liste des abréviations.....	7
SOMMAIRE	9
Avant Propos :	13
Liste des publications obtenues au sein du Groupe de Pathogénie Bactérienne :.....	15
<i>Structure et fonction du pilus chez Streptococcus pneumoniae</i>	17
INTRODUCTION.....	19
I Streptococcus pneumoniae	21
I.1 Présentation générale	21
I.2 Pathologies et données épidémiologiques.....	21
I.3 Les traitements	22
I.3.1 Les traitements préventifs.....	22
I.3.2 Les traitements curatifs et le développement des résistances	23
I.3.3 Vers de nouvelles cibles thérapeutiques.....	24
II Les facteurs de virulence	25
II.1 La capsule	25
II.2 La pneumolysine.....	25
II.3 Les protéines à LPxTG	26
II.4 Les protéines liées à la choline (CBPs).....	27
II.5 Les pili	28
III Les pili	28
III.1 Biogenèse des pili de type I chez les bactéries à Gram-négatif.....	30
III.1.1 Mécanisme général :.....	30
III.1.2 Mécanisme moléculaire d'assemblage	31
III.2 Biogenèse des pili chez les bactéries à Gram-positif.....	32
III.3 Conclusion sur les pili.....	33
IV Découverte du pilus chez le pneumocoque	34
V Les adhésines chez les bactéries à Gram-positif	35
V.1 Structure des adhésines de pili.....	36
VI Les sortases	38
VI.1 Structures des sortases.....	39
VII Les protéines structurales du pilus du pneumocoque	41
VII.1.1 La piline majeure : RrgB, 665 acides aminés	41
VII.1.2 La piline accessoire RrgC, 398 acides aminés.....	44
VII.1.3 L'adhésine RrgA : 893 acides aminés	44
VIII Objectif des travaux	46
MATERIEL ET METHODES	47
I Biologie moléculaire	49
I.1 Clonage de RrgA.....	49
II Biochimie	49
II.1 Surexpression de la protéine RrgA	49
II.2 Purification.....	50
II.2.1 Chromatographie d'affinité	50
II.2.1.1 Clivage de l'étiquette hexa-histidine	50
II.2.2 Chromatographie échangeuse d'anions	50
II.2.3 Chromatographie de filtration sur gel	50
II.3 Production de protéines sélénées.....	50
III Méthodes Biophysiques	51

III.1	Etude de la thermo-stabilité des protéines : Thermal Shift Assay (TSA)	51
III.1.1	Principe et objectif de la méthode.....	51
III.2	Cristallographie aux rayons X.....	52
III.2.1	Introduction.....	52
III.2.2	Anatomie d'un cristal.....	53
III.2.3	Cristallogenèse :	54
III.2.3.1	Technique de la goutte suspendue.....	55
III.2.4	Diffraction des rayons X	56
III.2.4.1	Génération du rayonnement X.....	56
III.2.5	Conditions de diffraction : la loi de Bragg.....	57
III.2.6	La carte de densité électronique.....	59
III.2.6.1	La diffusion anormale	60
III.2.6.2	Remplacement Moléculaire.....	61
III.3	Construction et affinement du modèle	62
III.4	Cristallogenèse et Collecte des données	63
III.4.1	Cristallogenèse	63
III.4.2	Collecte des données.....	63
RESULTATS		65
I	RrgA : résumé de l'article	67
II	Discussion	78
<i>Le Système de Sécrétion de Type III (T3SS) chez Pseudomonas aeruginosa</i>		79
INTRODUCTION.....		81
I	Pseudomonas aeruginosa	83
I.1	Présentation générale	83
I.2	Infections à <i>P. aeruginosa</i>	84
I.2.1	La mucoviscidose.....	84
I.2.2	Formation de biofilms	85
I.3	Traitements des infections à <i>P. aeruginosa</i>	85
I.3.1	Résistance aux antibiotiques.....	86
II	Le Système de Sécrétion de Type III (T3SS)	87
II.1	Généralités.....	87
II.2	Différentes familles de systèmes de sécrétion de type III	88
II.3	Régulation transcriptionnelle du T3SS.....	90
II.4	Description du système de sécrétion de type III.....	92
II.4.1	La base du système.....	94
II.4.1.1	Les protéines de la membrane interne	94
II.4.1.2	Les sécrétines.....	94
II.4.1.3	Les pilotines.....	97
II.4.2	L'aiguille de sécrétion	99
II.4.3	Le pore de translocation	100
II.4.4	Régulation de la sécrétion.....	100
II.4.4.1	La protéine « switch ».....	100
II.4.4.2	La plateforme de tri.....	101
II.4.5	Les toxines du système de sécrétion de type III chez <i>P. aeruginosa</i>	102
II.4.6	Les chaperonnes du T3SS.....	104
II.4.6.1	Mode de liaison des effecteurs (toxines, aiguilles, translocateurs).....	106
II.4.7	L'ATPase du système de sécrétion de type III.....	108
II.4.7.1	Structure de L'ATPase EscN chez <i>E. coli</i>	109
II.4.7.2	Une cible potentielle pour l'antibiothérapie.....	110
II.4.7.3	Un partenaire pour l'ATPase : YscL ; PscL ...	111
III	Objectif des travaux	112

MATERIEL ET METHODES	113
I Biologie moléculaire	115
I.1 Clonage	115
I.1.1 Clonage : PscN, PscL et ExsB de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	115
I.1.2 Le plasmide pG-KJE6	116
II Biochimie	117
II.1 Surexpression des protéines	117
II.1.1 Surexpression de la protéine PscN et du complexe PscN / PscL	117
II.1.2 Surexpression de la protéine PscL	117
II.1.3 Surexpression de la protéine ExsB	118
II.2 Purification des protéines d'intérêt	118
II.2.1 Chromatographie d'affinité	118
II.2.1.1 Etiquette hexa-histidine	118
II.2.1.2 Etiquette GST	118
II.2.2 Clivage des étiquettes	118
II.2.3 Chromatographie d'exclusion de taille	119
II.2.4 Chromatographie échangeuse de cations	119
II.3 Production des protéines sélénées	119
II.4 Pontage chimique	120
III Cristallographie aux rayons X	120
III.1 Cristallogénèse et collecte des données	120
III.1.1 Cristallogénèse de ExsB	120
III.1.2 Collecte des données de diffraction pour ExsB	120
RESULTATS	123
I PscN	125
I.1 Purification	125
I.1.1 GST-PscN	125
I.1.2 GST-PscN + chaperonnes	126
II PscL	127
II.1 Purification	127
II.2 PscL est un dimère	129
II.3 Protéolyse ménagée	130
III Le complexe PscN : PscL	131
III.1 GST-PscN + PscL	131
III.1.1 pEt-Duet : His-PscN : PscL	132
III.2 Cristallogénèse du complexe PscN : PscL	134
IV Discussion	135
V ExsB	136
V.1 Discussion	160
Autres articles publiés sur le Système de Sécrétion de Type III - Revues -	161
I Biogenesis, regulation, and targeting of the Type III Secretion System	163
II Membrane targeting and pore formation by the Type III Secretion System	
Translocon	174

Thèse soutenue par l'association « VAINCRE LA MUCOVISCIDOSE »

Avant Propos :

J'ai rejoint le Groupe de Pathogénie Bactérienne de l'IBS pour effectuer mon stage de Master II. Le sujet sur lequel j'ai travaillé pendant cette période de quelques mois concernait la caractérisation structurale et fonctionnelle de protéines impliquées dans la biogenèse du pilus du pneumocoque. Pendant ce stage, j'ai pu m'initier à la cristallographie aux rayons X en résolvant la structure d'une sortase, la sortase Srt-C3, en étroite collaboration avec Carlos Contreras-Martel et Clothilde Manzano, membres du groupe. Parallèlement à l'étude de cette sortase, j'ai initié des tests de cristallisation de RrgA, l'adhésine du pilus du pneumocoque, lesquels se sont avérés extrêmement prometteurs. A la fin de cette période de stage, j'ai émis le souhait de rester dans le groupe pour réaliser ma thèse et Andréa Dessen m'a alors proposé un sujet de thèse financée par Vaincre La Mucoviscidose, association s'intéressant à la biogenèse du Système de Sécrétion de Type III chez *Pseudomonas aeruginosa*, première cause d'infections chez les patients atteints de cette maladie génétique. Pendant la première année de ma thèse, j'ai donc travaillé parallèlement sur deux projets le temps de terminer les expériences et écrire un premier article sur RrgA. Cela explique que ce manuscrit soit composé de deux parties, une sur l'étude du pilus du pneumocoque et l'autre sur l'étude du Système de Sécrétion de Type III chez *Pseudomonas aeruginosa*.

Au cours de ma thèse, nous avons publié la majorité des résultats que nous avons obtenu et je compte aujourd'hui deux articles scientifiques et une revue en tant que premier auteur ainsi que deux articles et une revue supplémentaires en co-auteur. Pour cette raison, le manuscrit que je vous présente est une thèse sur publications. Une introduction ainsi qu'une section « Matériel et Méthodes » explique cependant le contexte scientifique de chacune de mes deux publications.

Liste des publications obtenues au sein du Groupe de Pathogénie Bactérienne :

Izoré T, Perdu C, Job V, Attrée I, Faudry E, Dessen A. (2011) Structural Characterization and membrane localization of ExsB from the type III secretion system (T3SS) of *Pseudomonas aeruginosa*. J.Mol.Biol. Accepted, In-press

Izoré T, Job V, Dessen A. (2011) Biogenesis, regulation, and targeting of the type III secretion system. Structure 19(5):603-12. Invited Review

Mattei PJ, Faudry E, Job V, Izoré T, Attree I, Dessen A. (2011) Membrane targeting and pore formation by the type III secretion system translocon. FEBS J 278(3):414-26. Invited Review

Izoré T, Contreras-Martel C, El Mortaji L, Manzano C, Terrasse R, Vernet T, Di Guilmi AM, Dessen A. (2010) Structural basis of host cell recognition by the pilus adhesin from *Streptococcus pneumoniae*. Structure 18(1):106-15.

Manzano C, Izoré T, Job V, Di Guilmi AM, Dessen A. (2009) Sortase activity is controlled by a flexible lid in the pilus biogenesis mechanism of gram-positive pathogens. Biochemistry 48(44):10549-57.

Manzano C, Contreras-Martel C, El Mortaji L, Izoré T, Fenel D, Vernet T, Schoehn G, Di Guilmi AM, Dessen A. (2008) Sortase-mediated pilus fiber biogenesis in *Streptococcus pneumoniae*. Structure 16(12):1838-48.

PREMIERE PARTIE :

Structure et fonction du pilus chez Streptococcus pneumoniae

INTRODUCTION

I *Streptococcus pneumoniae*

I.1 Présentation générale

C'est en 1881 que deux microbiologistes, George M. Sternberg aux Etats-Unis et Louis Pasteur en France, isolèrent cette bactérie organisée en paires ou en chainettes dans des échantillons de salive. Les deux chercheurs démontrent par la suite le rôle pathogène de la bactérie et l'identifient comme agent responsable de pneumonies, ce qui lui a valu d'être nommée *Diplococcus pneumoniae*. Ce n'est qu'en 1974 qu'elle prit le nom actuel de *Streptococcus pneumoniae* de part ses caractéristiques morphologiques lors de la croissance sous forme de chainettes en milieu liquide (du grec « Strepto » pour « chaîne » et « coccus » pour « graine »).



Figure 1 :
Cliché de microscopie
électronique de *S. pneumoniae*
non encapsulé

Streptococcus pneumoniae est une bactérie à Gram-positif, et est communément appelée « pneumocoque ».

Le pneumocoque réside sous deux formes différentes dites non-encapsulée et encapsulée, cette dernière étant la forme pathogène (Watson et Musher, 1990). La capsule est un déterminant antigénique majeur et son rôle dans les processus physiopathologiques est très important. La nature chimique de ces composés polysaccharidiques varie et à l'heure actuelle, 91 types de capsules ont été identifiés ce qui a permis de caractériser autant de sérotypes différents, le dernier ayant été identifié en 2007 (Park *et al.*, 2007).

I.2 Pathologies et données épidémiologiques

Streptococcus pneumoniae est une bactérie commensale des voies respiratoires supérieures, souvent à l'origine d'infections de la sphère oropharyngée, mais aussi de

pneumopathies communautaires et de méningites. La colonisation de la muqueuse du rhinopharynx se fait dès le troisième mois de vie du nourrisson pour atteindre un taux de portage maximum de 50% vers l'âge de 2 à 3 ans, notamment en hiver et chez les enfants vivant en collectivité. Ce taux diminue ensuite avec l'âge pour atteindre 5 à 10% chez l'adulte. L'infection clinique associant une réaction inflammatoire et une prolifération microbienne est généralement induite à la suite d'une infection virale ou lorsque le sujet possède un système immunitaire affaibli comme chez les jeunes enfants, les personnes âgées ou immunodéprimées. La migration de la bactérie vers des régions stériles conduit au développement de maladies dites non invasives comme les sinusites, les otites et les bronchites. L'accès aux poumons et le développement des pneumonies est facilité par deux composés bactériens sécrétés, la pneumolysine et une protéase spécifique des Immunoglobulines A1 humaines (Weiser 2010). Enfin, dans les cas les plus graves et sous l'action de neuraminidases et hyaluronidases qui dégradent le tissu conjonctif, le pneumocoque peut passer la barrière hémato-encéphalique et donner lieu à des infections invasives comme les méningites.

Un rapport de l'OMS évalue le nombre de personnes décédant chaque année d'une infection au pneumocoque à plus de 1,6 million, incluant 0,7 million d'enfants de moins de 5 ans (www.who.int).

En France, en 2008, 6679 cas d'infections invasives à *S. pneumoniae* ont été dénombrés parmi lesquels 611 méningites et 6068 bactériémies. Entre 2007 et 2008, sans considération d'âge, le nombre d'infections invasives a significativement augmenté (+14%) (Dorléans *et al.* 2010 ; INVS). Cependant, concernant les sujets entre 0 et 23 mois, le nombre de ce type d'infection est en forte diminution (-32,5%) probablement grâce à la large couverture du vaccin Prevenar®.

I.3 Les traitements

I.3.1 Les traitements préventifs

De nos jours, la vaccination est le principal moyen de prévenir les infections au pneumocoque dans les pays développés. Dès les années 1920, il fut montré que les polysaccharides capsulaires étaient antigéniques et pouvaient être intégrés dans un vaccin. Le premier vaccin fut créé en 1945 lorsque le docteur Bernhardt et son équipe ont immunisé des

patients avec des polysaccharides de la capsule (MacLeod *et al.*, 1945). Toutefois, l'enthousiasme grandissant autour des antibiotiques mena rapidement à l'abandon des recherches sur les vaccins. Ce n'est qu'au milieu des années 1960 que les polysaccharides de la capsule furent réellement étudiés. Depuis 2010, le groupe pharmaceutique Pfizer commercialise en France un vaccin conjugué (Prevenar13®) comportant des antigènes appartenant aux 13 sérotypes les plus communs dans les infections dues au pneumocoque. Ce vaccin se compose également d'une toxine diphtérique permettant une meilleure stimulation du système immunitaire des enfants en bas âge.

Le principal inconvénient de ce type de vaccin réside dans son coût de fabrication qui est très élevé mais aussi dans le fait que la protection reste restreinte à quelques sérotypes uniquement. En effet, d'une part, le coût de fabrication des vaccins conjugués rend difficile leur mise en œuvre dans les pays en voie de développement et d'autre part, ce vaccin laisse l'opportunité aux sérotypes non-vaccinaux de se développer, ce qui a dores et déjà été rapporté concernant l'utilisation d'un vaccin heptavalent (Prevenar®) en France mais aussi aux Etats-Unis (Lepoutre *et al.*, 2008, Moore *et al.*, 2008).

I.3.2 Les traitements curatifs et le développement des résistances

Avec l'utilisation intensive des antibiotiques, les premières souches résistantes à la pénicilline sont identifiées dès 1977 en Afrique du Sud dans un hôpital de Johannesburg (Jacobs *et al.*, 1978). Ces souches se sont alors rapidement disséminées à travers le monde et en 2002, en France, plus de 53% des souches de pneumocoques présentaient une sensibilité diminuée à la pénicilline (rapport d'activité 2009 du Centre National de Référence du Pneumocoque; www.invs.sante.fr). En 2008, de nombreux pays européens étaient confrontés à une forte incidence de souches de pneumocoques à sensibilité diminuée à la pénicilline (Figure 2), (Rapport annuel 2008 de l'EARSS : European Antimicrobial Resistance Surveillance System).



Figure 2 :
Carte de l'Europe représentant
l'incidence de pneumocoques de
sensibilité diminuée à la
pénicilline par pays en 2008.
(EARSS Annual report 2008)

Le développement de résistance à la pénicilline n'est pas un cas isolé et il a été rapporté des taux de résistances élevés à d'autres antibiotiques de la classe des β -lactamines (comme l'amoxicilline et le céfotaxime), mais aussi à d'autres classes d'antibiotiques notamment aux sulfamides, à la tétracycline et au chloramphénicol (CNRP, rapport d'activité 2009). De ce fait, un consensus médical de traitement des infections pneumococciques a vu le jour en 2008 et prévoit, pour les cas les plus difficiles, l'utilisation conjointe de deux céphalosporines de 3^{ème} génération, le Céftriaxone et le Céfotaxime (Fédération Française d'Infectiologie, www.infectiology.com).

I.3.3 Vers de nouvelles cibles thérapeutiques

L'émergence rapide de sérotypes non-vaccinaux (remplacement sérotypique) ainsi que l'évolution importante de phénomènes de résistance et de multi-résistance poussent les scientifiques à s'intéresser à de nouvelles cibles pour le développement de molécules à visée pharmaceutique afin de prévenir les infections aux pneumocoques. Les facteurs de virulence exposés à la surface bactérienne pourraient être des cibles potentielles. Ces derniers étant pour la plupart conservés chez de nombreux sérotypes, leur introduction dans un vaccin pourrait limiter l'émergence de nouvelles souches.

II Les facteurs de virulence

Les facteurs de virulence du pneumocoque sont très importants dans les étapes de colonisation et d'infection et ne sont pas tous exprimés de la même façon par les différents sérotypes. Ceci explique en partie la différence de toxicité des différentes souches (Mitchell et Mitchell, 2010). Le pneumocoque possède de nombreux facteurs de virulence et le rôle des plus importants d'entre eux sera détaillé dans les prochains paragraphes.

II.1 La capsule

La capsule polysaccharidique est probablement le facteur de virulence le plus important chez le pneumocoque. En effet, celle-ci joue un rôle protecteur majeur notamment contre les anticorps exprimés par l'hôte. En absence de capsule, les anticorps se lient à la surface de la bactérie et active la cascade du complément. Dans le cas de souches encapsulées, la présence de cette couche polysaccharidique empêche les anticorps et le fragment iC3b issu du complément d'atteindre leurs récepteurs à la surface de la bactérie. Ceci a pour effet de diminuer l'opsonisation de la bactérie par les macrophages (Hyams *et al.*, 2010). La capsule protège aussi de la clairance mucociliaire, de certaines molécules antibiotiques et de l'autolyse bactérienne (Nelson *et al.*, 2007a ; Van der Poll, 2009).

II.2 La pneumolysine

La pneumolysine est une cytotoxine de 52 kDa présente au sein du cytoplasme de toutes les souches de pneumocoque. Lors de la lyse des bactéries, cette Cytolysine Dépendante du Cholesterol (CDC) est libérée en très grande quantité à proximité de la membrane des cellules hôtes.

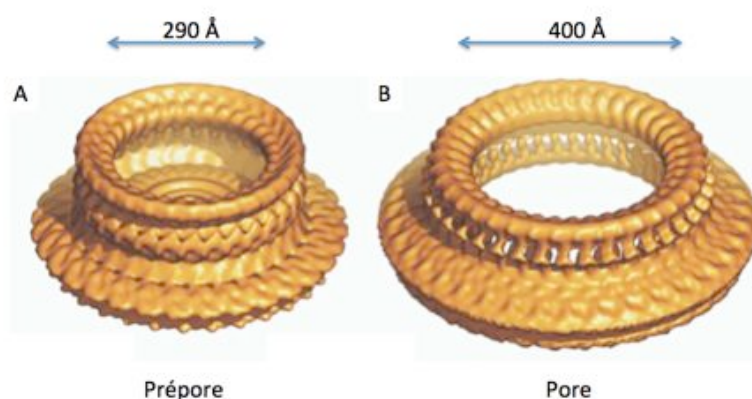


Figure 3: Pore formé par la pneumolysine

Cliché de microscopie électronique du pré-pore et du pore de pneumolysine.

Les monomères s'assemblent pour former un pré-pore puis un pore (Tilley *et al.*, 2005).

L'oligomérisation des monomères de pneumolysine conduit à la formation du pré-pore. Dans un deuxième temps, des changements structuraux très importants sont effectués, notamment la transition de tout un domaine d'une forme hélicale vers une forme en feuillet bêta qui va s'enchâsser dans la membrane et *in fine*, mener à la formation du pore. Un tel pore, avec un diamètre de près de 400 Å (Figure 3), induit des dysfonctionnements cellulaires majeurs conduisant à la mort de la cellule (Tilley *et al.*, 2005).

Lorsque la concentration ne permet pas la formation d'un pore, principalement pendant les premières étapes de l'infection, il a été démontré que la pneumolysine pouvait causer d'autres effets comme l'induction de l'apoptose (Braun *et al.*, 2002), l'activation de la voie du complément (Mitchell *et al.*, 1991) et induire des réactions pro-inflammatoires au niveau des cellules immunitaires (Cockeran *et al.*, 2001).

II.3 Les protéines à LPxTG

Les protéines à motif LPxTG sont une grande famille de protéines associées de manière covalente au peptidoglycane par une enzyme appelée sortase. Les protéines possédant ce motif sont ancrées à la surface de la bactérie. Le pneumocoque exprime de nombreux facteurs de virulence utilisant ce motif. Il s'agit notamment de la hyaluronidase, de la neuraminidase de la protéase à sérine PrtA et de la protéase des IgA1.

- La hyaluronidase dégrade les acides hyaluroniques qui sont des composants de la matrice extracellulaire. Comme il a été montré pour les triponèmes (agent causal de la syphilis, bactéries de la famille des spirochetes), (Fitzerald *et al.*, 1987), l'action de cette protéine facilite la dissémination du pathogène au sein de l'hôte (Paton et Ferrante, 1983) mais provoque aussi l'inflammation des tissus pulmonaires via l'interaction avec des cytokines pro-inflammatoires (Mitchell et Mitchell, 2010).
- La neuraminidase, comme son nom l'indique, est une enzyme qui dégrade l'acide N-acétylneuraminique présent dans les glycolipides, les lipoprotéines et les oligosaccharides à la surface des cellules. Ceci permet à la bactérie d'avoir accès à de nombreux récepteurs membranaires normalement masqués. De plus, les effets de la neuraminidase pourraient favoriser la formation de biofilms (Trappetti *et al.*, 2009).

- PrtA est une protéine récemment découverte suite à une recherche génomique sur le sérum de patients ayant été infectés par différentes souches de pneumocoque. Peu de choses sont connues sur cette protéine de la famille des subtilases (protéases à sérine comme la subtilisine). Cependant son rôle dans la virulence a clairement été démontré en modèle murin et de nombreuses recherches s'intéressent maintenant à cette protéine. En effet, une souche mutante n'exprimant pas cette protéine présente une virulence amoindrie (Bethe *et al.*, 2001). Il est aussi important de noter que l'expression de PrtA est co-régulée avec d'autres facteurs de virulence, comme la pneumolysine et le pilus de type I (PI-I), par le facteur de transcription (Psa)R.
- La protéase des IgA1
Le pneumocoque possède une protéase particulière capable de dégrader les immunoglobulines A1 (IgA1) entre la région spécifique et le fragment commun (Fc). Ces IgA1 sont les anticorps les plus nombreux au niveau du site d'interaction hôte pathogène. L'activité de la protéase conduit à une immunoglobuline tronquée, où le fragment commun (Fc) n'est plus présent. De ce fait, les récepteurs du Fc à la surface des cellules de l'immunité ne reconnaissent plus leur cible (Weiser, 2010).

II.4 Les protéines liées à la choline (CBPs)

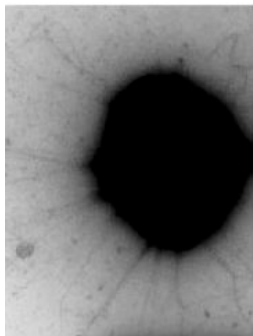
Les CBPs (pour Choline Binding Proteins) sont une famille de protéines associées à la surface de la bactérie via l'interaction non covalente avec les résidus cholines présents au niveau des acides teichoïques et lipoteichoïques au sein de la paroi bactérienne. Le nombre de CBPs est dépendant du sérotype considéré et nombreuses sont celles qui sont impliquées dans la virulence. Nous pouvons notamment citer les quatre principales : les enzymes hydrolytiques LytA, LytB, LytC et CbpE.

- L'autolysine LytA joue un rôle important dans la virulence car son activité lytique (N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase) induit le relargage de produit de dégradation du peptidoglycane possédant une activité hautement inflammatoire. De plus, il a été récemment montré qu'une déficience en autolysine provoquait une diminution drastique de la virulence en modèle murin (Hirst *et al.*, 2008). En effet, après inoculation cérébro-rachidienne de souches pathogènes de pneumocoque, les souris

meurent en 26 heures pour la souche sauvage et survivent à l'infection lorsque cette même souche est délétée de *LytA*.

- Les enzymes *LytB*, *LytC* et *CbpE* sont impliqués dans la colonisation du nasopharynx (Gosink *et al.*, 2000) mais leur rôle précis n'est pas encore bien connu. *LytB* est une muramidase, *LytC* est une protéine de la famille du lysosyme et *CbpE* possède une affinité pour le plasminogène qui permettrait de faciliter le passage de la bactérie vers les tissus profonds de l'hôte (Attali *et al.*, 2008).

II.5 Les pili



Certaines souches de pneumocoque possèdent des structures protéiques appelées pili à leur surface (Figure 4). Il existe deux types de pili différents chez le pneumocoque pour lesquels la nomenclature est basée selon leur date de découverte. PI-I (Pathogenicity-Islet I) a été découvert en 2006 (Barocchi *et al.*, 2006) et PI-2 en 2008 (Bagnoli *et al.*, 2008). Les pili ont pour fonction principale d'augmenter la capacité d'adhésion du pneumocoque sur les cellules de l'hôte.

Figure 4: Cliché de microscopie électronique en coloration négative de *S. pneumoniae* mettant en évidence la présence des pili (Barocchi *et al.*, 2006)

L'ensemble des facteurs de virulence du pneumocoque est détaillé dans deux revues récentes de grand intérêt :

J. N. Weiser (2010) : The pneumococcus : Why a commensal misbehaves.

A.M. Mitchell et T.J. Mitchell (2010) : *Streptococcus pneumoniae* : Virulence factors and variation.

III Les pili

Les pili sont des structures associées à la surface des bactéries, qu'elles appartiennent à la classe des Gram-positif ou des Gram-négatif. Ils sont définis comme étant des structures protéiques non flagellaires composées de plusieurs sous-unités assemblées (Kline *et al.*,

2010). Ils ont tout d'abord été observés chez les bactéries à Gram-négatif en 1949 par Anderson et Houwink puis en 1968 chez l'organisme à Gram-positif *Corynebacterium renale* (Yanagawa *et al.*, 1968). Dès lors, de nombreux noms leur ont été attribués comme « poils, cils, filaments, fimbriaes, fibrilles, aiguilles et pili » mais au fil du temps, les noms de pili et de fimbriae se sont imposés (Fronzes *et al.*, 2008) ; les termes de « filaments » et d'« aiguilles » étant aujourd'hui associés au flagelle et à l'injectisome de type III (Cornelis, 2006). Les pili sont impliqués dans de nombreuses fonctions cellulaires comme l'adhésion sur les tissus hôtes, l'agrégation cellulaire, la formation de biofilms (Mandlik *et al.*, 2008), l'immunomodulation, la motilité (Jin *et al.*, 2011) et le transfert d'ADN (Koebnik R, 2001). Evidemment, un seul type de pili n'est pas capable de toutes ces fonctions et il a été démontré que les pili des bactéries à Gram-négatif appartiennent à une des classes suivantes : les pili de type I qui sont les plus récurrents, les pili de type IV ou les pili de type curli (Telford *et al.*, 2006 ; Fronzes *et al.*, 2008). Dans ce manuscrit, je ne détaillerai que les ressemblances et différences des pili de type I, assemblés par la voie « Chaperone-Usher » chez les bactéries à Gram-négatif, avec les pili assemblés par la voie des sortases chez les Gram-positif. Ce choix est motivé par les similitudes fonctionnelles de ces deux structures (adhésion sur tissus hôtes, agrégation, formation de biofilm et immuno-modulation), (Mandlik *et al.*, 2007 ; Telford *et al.*, 2006).

En effet, bien que le mécanisme d'assemblage soit complètement différent (Figures 5 et 7), on oublie souvent que les pili, quelque soit l'organisme qui les produit, doivent répondre à certaines caractéristiques primordiales. Le rôle des pili est de créer une liaison extracellulaire entre deux organismes. Cette liaison peut s'établir entre deux bactéries, comme c'est le cas pour le transfert d'ADN notamment, ou entre un pathogène/symbiote et son hôte. Dans les deux cas, la bactérie doit être capable de former une liaison stable et très résistante au milieu extérieur et aux défenses immunitaires. Les bactéries à Gram-positif ont pour cela développé une stratégie différente de celle utilisée par les Gram-négatif mais toutes deux présentent une remarquable efficacité.

III.1 Biogenèse des pili de type I chez les bactéries à Gram-négatif.

III.1.1 Mécanisme général :

Les pili de type I sont les pili les plus représentés chez les bactéries et leur assemblage ainsi que leurs fonctions sont bien connus. La figure 5 ci dessous, présente les principales étapes de formation de ces pili assemblés par la voie « chaperone-usher ».

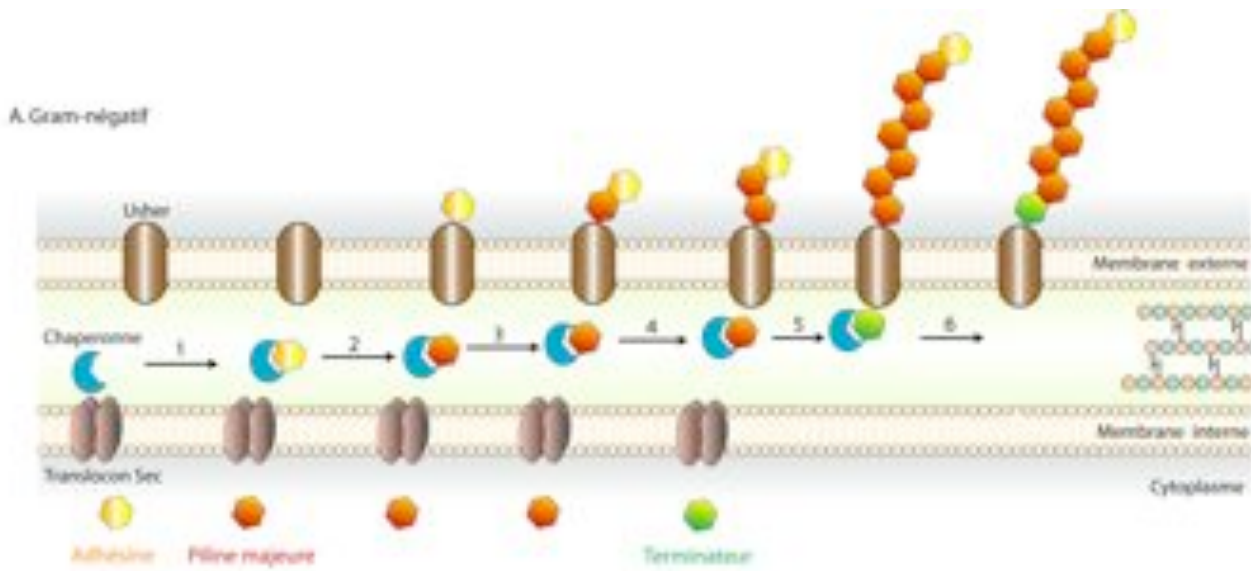


Figure 5 : Modèle d'assemblage des pili selon la voie « Chaperone-Usher ».

Les pilines, sont exportées jusqu'au périplasma par la machinerie de sécrétion sec. Une fois dans le périplasma, elles sont prises en charge par une chaperonne spécifique puis sécrétées via le « Usher », une protéine membranaire. La polymérisation des pilines se fait spontanément par échange de brin donneur à la surface de la bactérie.

Modèle construit à partir de la revue de K. Kline (Kline *et al.*, 2010).

Dans ce système, les sous-unités formatrices du pilus, les pilines, sont ajoutées par le bas. Une adhésine, doit être positionnée au sommet du pilus (Jones *et al.*, 1995 ; Lindberg *et al.*, 1987) et est donc la première protéine à être sécrétée. L'adhésine est importée dans le périplasma via la machinerie de translocation « sec ». Une fois dans le périplasma, celle-ci va être prise en charge par une chaperonne (Figure 5, étape 1) pour limiter la dénaturation de la protéine dans le périplasma et être escortée jusqu'au « usher », une protéine membranaire servant de plateforme d'assemblage et permettant la sécrétion des pilines (étape 2). À son tour, la piline majeure est sécrétée par le système et s'associe avec l'adhésine. Contrairement à l'adhésine, plusieurs molécules de piline majeure sont sécrétées et interagissent pour former le corps du pilus (étape 3, 4 et 5). Enfin, un terminateur est sécrété à la base du pilus en cours de synthèse provoquant l'arrêt de la biogenèse de celui-ci (Baga *et al.*, 1987).

III.1.2 Mécanisme moléculaire d'assemblage

Comme expliqué précédemment, les pilines doivent former une structure très cohésive, résistante au milieu extérieur et au système immunitaire de l'hôte. La stratégie développée ici repose sur « l'échange de brin donneur ». En 2007, l'équipe du Professeur Gabriel Waksman a piégé un complexe de deux pilines majoritaires dont l'une est associée à une chaperonne (Verger *et al.*, 2007), (Figure 6).

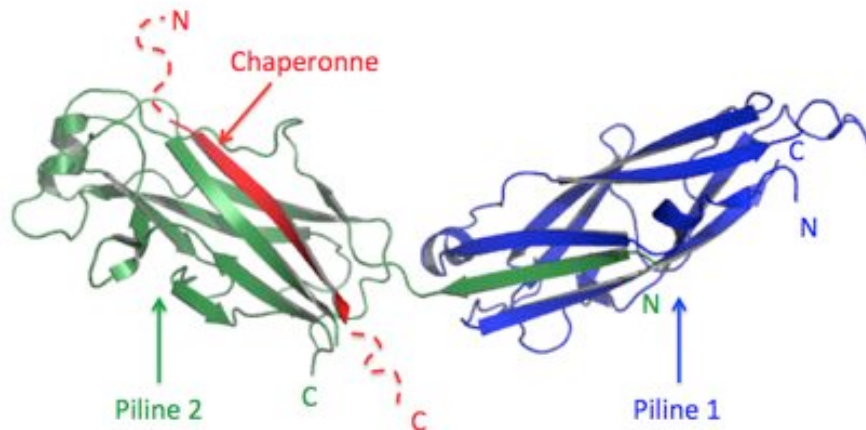


Figure 6 : Structure d'un complexe entre deux pilines majoritaires et une chaperonne.

Les deux pilines sont associées entre elles par un mécanisme appelé échange de brin donneur. La piline 2 est associée à une chaperonne par le même mécanisme. Ceci permet aux pilines de se stabiliser mutuellement et de créer un complexe d'une grande affinité. (D'après Verger *et al.*, 2007).

Les sous-unités pilines possèdent un repliement proche des immunoglobulines avec deux variations. La première est que le brin bêta C-terminal classique est absent, laissant une cavité tout au long de la structure de la protéine. La deuxième variation est une extension amino-terminale. Au cours de la polymérisation des pilines, l'absence du brin bêta de la piline en position « i » est complétée par l'extension amino-terminale de la piline en position i+1 (Figure 6). Ainsi, le repliement immunoglobuline complet est reconstitué, la structure est stabilisée et les pilines sont intimement associées. Dans le cas où le pilus est en cours de polymérisation, la dernière piline est stabilisée par un brin bêta appartenant à sa chaperonne (Figure 6). Lorsque la piline suivante sera intégrée à la fibre, son extrémité amino-terminale viendra déplacer le brin bêta de la chaperonne de la piline précédente selon un mécanisme appelée « échange de brin donneur ». Le complexe ainsi formé, bien que non-covalent, permet une grande stabilité de la structure.

III.2 Biogenèse des pili chez les bactéries à Gram-positif.

La biogenèse des pili des bactéries à Gram-positif repose sur l'action spécifique d'enzymes, appelées les sortases (Ton-that et Schneewind, 2003). Un paragraphe particulier leur est dédié dans ce manuscrit car l'étude de ces enzymes dans la biogenèse du pilus est très importante. De plus, au cours de mon stage de Master II, j'ai participé à la caractérisation structurale de ces enzymes, projet initié en 2006 au sein de notre groupe. Ces enzymes sont des transpeptidases à cystéine et catalysent l'association covalente des pilines entre elles. Les sortases reconnaissent un motif particulier sur la protéine partenaire, il s'agit du motif LPxTG (Schneewind *et al.*, 1992). La réaction de transpeptidation s'effectue en deux étapes. Une première étape où la chaîne latérale de la cystéine catalytique conservée réalise une attaque nucléophile entre la thréonine et la glycine du motif LPxT-G formant ainsi un complexe acyl-enzyme covalent de séquence LPxT-C. Lorsque l'accepteur final de la réaction est à proximité, ce motif est de nouveau attaqué et la sortase perd son substrat au profit de l'accepteur. C'est la réaction de transpeptidation.

La figure 7 suivante met en évidence leur rôle primordial dans la biogénèse des pili chez les bactéries à Gram-positif.

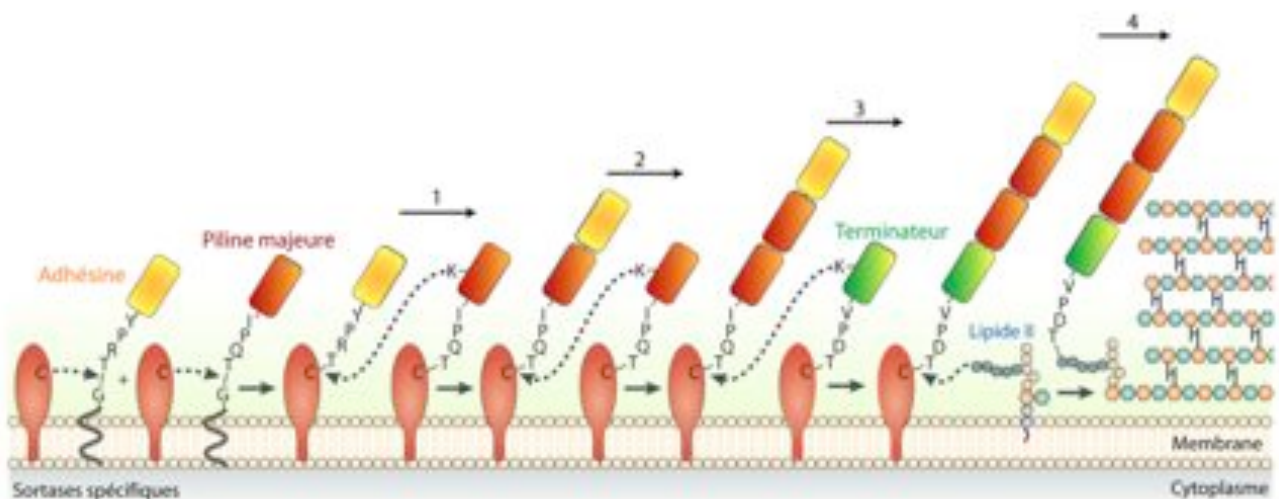


Figure 7: Modèle d'assemblage des pili chez les bactéries à Gram-positif

Les pilines, sont exportées jusqu'à leur lieu d'assemblage par la machinerie de sécrétion sec. Une fois à l'extérieur, elles sont prises en charge par leur sortase spécifique. L'adhésine est associée à une piline majeure (1), puis les pilines majeures sont polymérisées pour former le corps du pilus (2). Enfin un terminateur est intégré à la base du pilus (3) puis l'ensemble de la structure est transféré sur le lipide II, précurseur du peptidoglycane.

Modèle adapté de la revue de AP. Hendrickx (Hendrickx *et al.*, 2011).

Chez les bactéries à Gram-positif, les pilines possèdent toutes un motif LPxTG dégénéré qui leur est propre et qui leur permet d'être prises en charge par une sortase spécifique ancrée à la membrane. Dans ce modèle, l'adhésine et la piline majoritaire sont ancrées à la membrane via leur queue hydrophobe (Figure 7). Dans un premier temps, elles subissent l'attaque nucléophile de leur sortase spécifique et un complexe acyl-enzyme est formé. La piline majoritaire possède un motif supplémentaire, appelé « motif piline » (Tonthat et Schneewind, 2003) au sein duquel une lysine en surface est strictement conservée. Le groupement ϵ amino de cette lysine conduit une nouvelle attaque nucléophile sur le motif LPxTC du complexe adhésine-sortase (étape 1) et mène à la liaison covalente de l'adhésine sur la piline majoritaire. Dans un deuxième temps, les attaques répétées des pilines majoritaires sur elles-mêmes permettent la croissance du pilus (étape 2). Enfin, l'incorporation d'une piline accessoire à la base du pilus joue probablement le rôle de terminateur (étape 3) et le pilus ainsi formé est transféré sur le lipide II, précurseur du peptidoglycane (Hendrickx *et al.*, 2011).

III.3 Conclusion sur les pili

Comme on peut le voir en comparant les deux modèles d'assemblages, les pili des bactéries à Gram-positif et les pili de type I des Gram-négatif sont à première vue relativement semblables. Ils ont une même fonction, celle de projeter une adhésine à distance de la paroi bactérienne et une même architecture globale. Seule la biogenèse du pilus est différente puisque les pilines sont associées de manière covalente chez les Gram-positif et sont stabilisées par échange de brin bêta chez les Gram-négatif.

Etant des facteurs de virulence importants, les pili sont rapidement devenus des cibles potentielles pour l'antibiothérapie et des inhibiteurs ont été développés contre les chaperonnes de la voie « Chaperone-Usher » et contre les sortases (Chorell *et al.*, 2010 ; Maresso et Schneewind., 2008). Chez les bactéries à Gram-positif, les pilines et les sortases servant à la biogenèse du pilus diffèrent d'une espèce à l'autre et parfois même d'un sérotype à l'autre (Mandlik *et al.*, 2007). Il est donc important d'étudier spécifiquement, organisme par organisme, la biogenèse des pili. Au laboratoire, nous étudions le pilus (PI-I) du pneumocoque.

IV Découverte du pilus chez le pneumocoque.

En 2002, après le séquençage complet des génomes de plusieurs souches de pneumocoque, l'équipe du Dr Camilli met en évidence un locus particulier au sein du sérotype 4 de *S. pneumoniae* (Figure 8). Ce locus est un opéron codant pour un régulateur transcriptionnel RlrA (Rof-like regulator gene A) et six autres protéines dont trois possèdent des similarités de séquence avec des protéines de la famille des MSCRAMM (Microbial Surface Component Recognizing Adhesive Matrix Molecules) connues pour leurs fonctions d'adhésion favorisant l'interaction des bactéries avec les tissus des cellules de l'hôte (Patti *et al.*, 1994 ; Joh *et al.*, 1999). Ces trois protéines sont dénommées RrgA, RrgB et RrgC pour « Rof-like regulated gene » et possèdent toutes un motif de reconnaissance aux sortases. Les trois protéines restantes codées par l'opéron présentent justement de fortes homologues de séquence avec les protéines de la famille des sortases et sont appelées Srt-C1, Srt-C2 et Srt-C3 (Hava et Camilli, 2002). Par ailleurs, les auteurs montrent par mutagenèse que RrgA et la sortase Srt-C3 sont importantes pour la virulence de la souche.

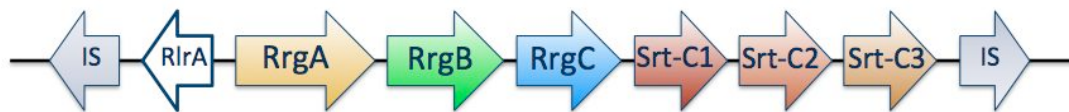


Figure 8 : Schéma de l'îlot de pathogénicité PI-I chez *S. pneumoniae*
(Hava et Camilli, 2002)

Ce n'est que 4 ans plus tard, que l'équipe de B. Henriques-Normark met en évidence le lien entre cet opéron et la présence du pilus chez le pneumocoque (Barocchi *et al.*, 2006). Bien qu'il ne soit exprimé que chez 30% des souches (Aguiar *et al.*, 2008), Barocchi et ses collègues montrent que la présence du pilus est associée à une exacerbation de la virulence de la souche en modèle murin (Figure 9). En effet, après inoculation intra-nasale de la souche sauvage, seulement 10% des souris survivent après deux jours contre 55% pour la souche Δ (*rrgA*, *srt-C3*).

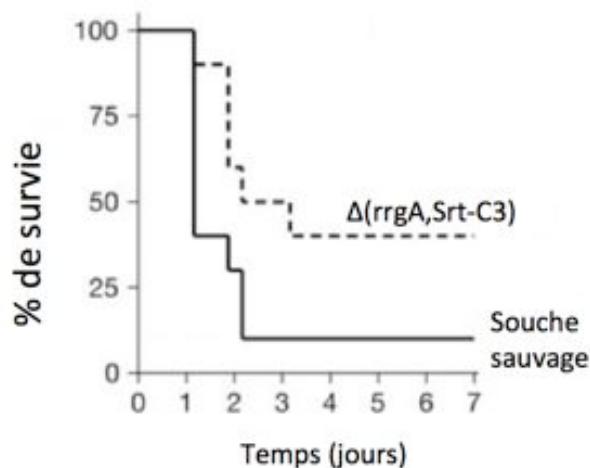


Figure 9: étude de la virulence de la bactérie en absence de la piline mineure RrgA et de la sortase Srt-C3 .

Des souris sont infectées par une souche de *S. pneumoniae* sauvage ou déletée pour les gènes *rrgA* et *srt-C3*. Le pourcentage de survie est indiqué en fonction du temps. (Barocchi *et al.*, 2006)

Comme on peut le voir, le pilus du pneumocoque joue un rôle prépondérant dans la virulence de la bactérie. L'étude de ces pili, leur biogenèse mais aussi leur structure, permettra de mieux comprendre leur rôle comme facteur de virulence. Une revue récente met en évidence que les pili exprimés à la surface des bactéries à Gram-positif possèdent généralement une architecture génétique commune, avec au minimum une sortase pour catalyser l'attachement des pilines entre elles, une adhésine et une piline majeure sur laquelle l'adhésine est attachée (Kreikemeyer *et al.*, 2011). Il est donc indispensable d'étudier ces protéines afin d'en comprendre la fonction et, à terme, développer des molécules dirigées spécifiquement contre elles.

V Les adhésines chez les bactéries à Gram-positif

L'adhésion des bactéries aux tissus de l'hôte est une étape critique pour l'établissement de la pathogénie. Cette étape est cependant rendue difficile par la répulsion électrostatique engendrée par les membranes des deux cellules. Pour cette raison, les bactéries ont développé des adhésines dont la structure est telle que le domaine fonctionnel est projeté à distance de la paroi, augmentant ainsi les chances de rencontre avec le substrat. D'après Krishnan et Narayana (Krishnan et Narayana, 2011), il existe majoritairement deux types d'adhésines chez les bactéries à Gram-positif : les MSCRAMMs (Microbial Surface Component Recognizing Adhesive Matrix Molecules) qui sont ancrées à la paroi des bactéries par la sortase A et les adhésines projetées au sommet des pili. Parmi les MSCRAMMs, les structures de plusieurs protéines en complexe avec leurs substrats ont permis d'identifier le

site protéique impliqué dans l'adhésion. En effet, les structures des protéines Cna de *S. aureus* en complexe avec du collagène (Zong *et al.*, 2005) et de ClfA (Clumping Factor A) en complexe avec du fibrinogène (Ganesh *et al.*, 2008), par exemple, permettent d'identifier avec précision le type d'interaction de ces adhésines avec leurs substrats. Concernant les adhésines des pili, il n'existe encore aucune structure obtenue en complexe avec un substrat, ce qui peut rendre difficile le développement de molécules inhibitrices.

Etant souvent multi modulaires (Krishnan *et al.*, 2007 ; Figure 10), les adhésines des pili chez les Gram-positif peuvent utiliser différents domaines d'origine eucaryotes et procaryotes (Izoré *et al.*, 2010 ; Konto-Ghiorghi *et al.*, 2009) pour lier leur substrat. En effet des domaines issu des intégrines, des domaines de type IgG-Cna ou encore des domaines von Villebrand de type A sont couramment mis en évidence par l'analyse de séquence des adhésines des pili. Etant donné leur variabilité de structure, l'étude des pilines doit être spécifique à un organisme et est difficilement adaptable à d'autres bactéries.

V.1 Structure des adhésines de pili.

Mise à part la structure de RrgA, présentée en partie résultats et qui représente la plus grande des adhésines de structure connue à ce jour, il n'existe actuellement que deux structures d'adhésines de pilus (Figure 10).

Comme on peut le voir sur la figure suivante, les adhésines des pili sont très différentes, aussi bien en taille que dans les domaines mis en jeu lors de la reconnaissance de leur substrat.

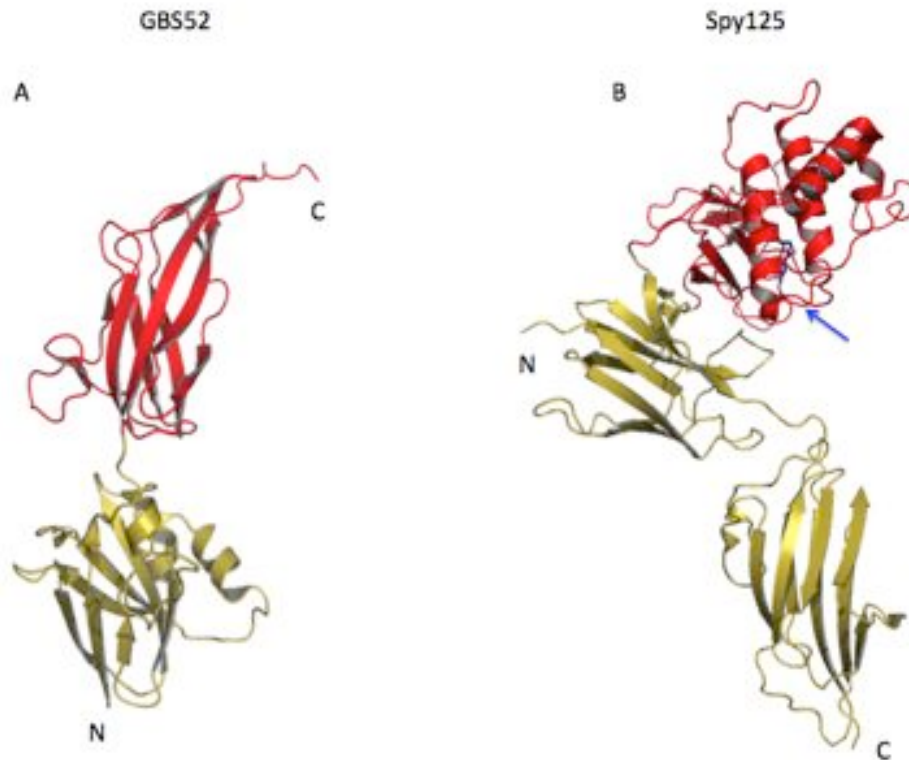


Figure 10 : Comparaison des structures des adhésines de *S. agalactiae* GBS52 et de *S. pyogenes* Spy125

GBS52 est une protéine composée de deux domaines IgG-CnaB like, Spy125 est composée de deux domaines IgG-CnaB like et d'un domaine de structure inconnue. Les domaines « piédestal » sont représentés en jaune et le domaine fonctionnel, médiant l'adhésion est coloré en rouge dans les deux cas. La flèche bleue marque la présence d'un pont thioester au sein de ce domaine.

GBS52 : Krishnan *et al.*, 2007 ; Code PDB: 3PHS

Spy125 : Pointon *et al.*, 2010 ; Code PDB : 2XID

Les domaines IgG-like sont des domaines retrouvés chez toutes les pilines connues à ce jour. GBS52 et Spy125 n'échappent donc pas à cette règle. GBS52 est l'adhésine du pilus du pathogène *S. agalactiae* et est composée de deux domaines IgG-like dont un, le domaine carboxy-terminal, porte la fonction d'adhésion (domaine rouge, Figure 10a). En effet, couplé à des billes fluorescentes, seul le domaine C-terminal possède la capacité d'adhérer aux cellules épithéliales pulmonaires (Krishnan *et al.*, 2007).

Spy125 est l'adhésine du pilus du pathogène *S. pyogenes*. Cette adhésine est très intéressante du point de vue du mécanisme d'adhésion proposé. En effet, le domaine impliqué dans la reconnaissance des cellules de l'hôte (domaine rouge, Figure 10b) possède un nouveau repliement qui n'avait encore jamais été décrit. Au sein de ce domaine, les auteurs ont identifié une liaison thioester entre la chaîne latérale des résidus cystéine 426 et glutamine 575 (flèche bleue, Figure 10b). Il a été montré que la mutation de la cystéine 426 en alanine

n'avait aucun effet particulier sur la stabilité de la protéine mais diminuait de manière drastique (-75%) la capacité des bactéries à se lier à leur hôte. L'équipe du Dr. Banfield propose donc que cette liaison thioester puisse s'hydrolyser et reformer une liaison covalente avec un résidu de la protéine de l'hôte (Pointon *et al.*, 2010). Pour pouvoir confirmer leur hypothèse, les auteurs doivent dans un premier temps identifier la protéine cible eucaryote.

VI Les sortases

Comme expliqué précédemment les sortases sont des transpeptidases à cystéine. Elles réalisent le transfert covalent d'une protéine sur une autre protéine ou un substrat. On connaît actuellement quatre classes de sortases définies selon la proximité génétique et le substrat de chaque enzyme (Dramsi *et al.*, 2005). Le tableau suivant (Tableau 1) permet de résumer le rôle de chaque classe de sortases.

Tableau 1 : Caractéristiques des quatre classes de sortases (Dramsi *et al.*, 2005, Hendrickx *et al.*, 2011).

Classe	Substrats	Motifs	Accepteur
A	Protéines de surface	LPXTG	Peptidoglycane
B	Protéines d'acquisition au fer	NP(Q/A)XTN	Peptidoglycane
C	Pilines	(I/L)(P/A)XTG	Piline
D	Facteurs de sporulation	LPNTA	Peptidoglycane

Les sortases de classe A ne sont pas très spécifiques. Elles catalysent l'association de nombreuses protéines au peptidoglycane (Mazmanian *et al.*, 1999). Elles sont pour cela appelées les sortases « Housekeeping ».

Les sortases de classe B sont exprimées par certaines espèces de *Staphylococcus* spp., *Bacillus* spp., *Listeria* spp. et *Clostridium* spp. uniquement et sont impliquées dans le transport du fer (Hendrickx *et al.*, 2011 ; Maresso et Schneewind, 2006).

Les sortases de classe C sont les sortases impliquées dans la polymérisation des pili (Hendrickx *et al.*, 2011).

Enfin, les sortases de classe D sont exprimées chez les organismes sporulants, comme *Bacillus* spp. et *Streptomyces* spp. (Hendrickx *et al.*, 2011).

Cette classification n'est cependant pas stricte puisqu'il a récemment été démontré qu'une sortase de classe B (Spy129) était impliquée dans l'assemblage du pilus chez *Streptococcus pyogenes* (Kang *et al.*, 2011), voir paragraphe suivant.

VI.1 Structures des sortases

Au cours de mon stage de Master II au sein du Groupe de Pathogénie Bactérienne, j'ai été impliqué dans la résolution de la structure de la sortase Srt-C3 du pneumocoque et ai participé à l'écriture de deux articles faisant partie intégrante de la thèse de Clothilde Manzano (Manzano *et al.*, 2008 ; Manzano *et al.*, 2009). Pour cette raison, ces articles ne figurent pas dans ce manuscrit. Néanmoins, ces enzymes jouent un rôle primordial dans la synthèse du pilus SPI-1 et donc il me paraît important de dédier un paragraphe à la structure de ces enzymes.

Actuellement, il existe des structures à haute résolution des sortases de classe A, B et C mais aucune de classe D. Les premières structures résolues sont celles des sortases A et B de *Staphylococcus aureus* (Zong *et al.*, 2004a ; Zong *et al.*, 2004b). Il faudra attendre 2008 pour obtenir les premières structures des sortases de classe C (Manzano *et al.*, 2008). La figure 11 permet de comparer la structure de la sortase A de *S. aureus* (orange ; Zong *et al.*, 2004) avec les structures des sortases impliquées dans la biogenèse des pili chez *S. pyogenes* (bleue ; Kang *et al.*, 2011) et *S. pneumoniae* (Marron; Manzano *et al.*, 2008, Neiers *et al.*, 2009).

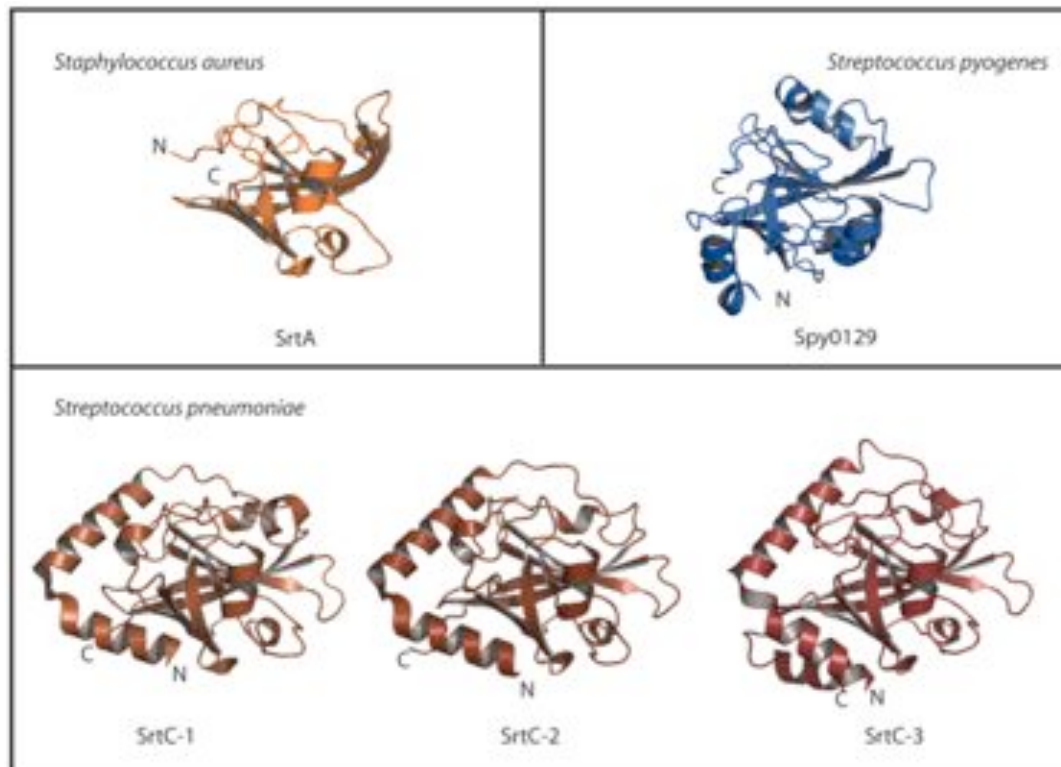


Figure 11: Galerie de structures de sortases

SrtA : 1T2P

Spy0129 : 3PSQ

Srt-C1 : 2WIJ

Srt-C2 : 3G66

Srt-C3 : 2WIK

Comme on peut le voir sur la galerie précédente (Figure 11), la sortase de classe A, partage son cœur en feuillet bêta avec les sortases de classe B (Spy0129) et de Classe C (Srt-C). Le cœur est formé de 8 brins bêta très conservés structuralement puisqu'ils portent le site catalytique. Les sortases de classe B et C ont cependant de nombreuses boucles et hélices supplémentaires décorant le tonneau bêta. Il a été montré pour les sortases de classe C que certaines boucles (appelées « lid ») étaient impliquées dans la stabilité de la protéine et recouvrait le site actif (Manzano *et al.*, 2009). L'hypothèse que ce « lid » puisse être impliqué dans la spécificité de reconnaissance des sortases pour leur substrat est une théorie à confirmer. Par ailleurs, il a été montré que l'échange d'une boucle entre deux brins bêta de la SrtA chez *S. aureus* par la boucle correspondante issue de la SrtB, permettait à la SrtA de reconnaître le motif NPQTN (spécifique des sortases de classe B) au lieu du motif habituel LPxTG (Bentley *et al.*, 2007). Ceci montre l'importance des boucles autour du cœur en feuillet bêta dans la reconnaissance des substrats par les sortases. Il est aussi important de

noter que la structure de la sortase Spy0129 ne possède pas de « lid » et que son site catalytique est relativement exposé, contrairement aux sortases de classe C (Kang *et al.*, 2011). Il est assez surprenant de voir qu'une sortase de classe B comme Spy0129 puisse avoir une activité de biogenèse de pili. Ceci montre à quel point l'assemblage des pili chez les bactéries à Gram-positif est un mécanisme complexe et pour lequel il existe des variations propres à chaque espèce.

VII Les protéines structurales du pilus du pneumocoque

L'îlot de pathogénicité permettant l'expression du pilus chez le pneumocoque encode trois protéines dites « structurales ». En effet, contrairement aux sortases qui l'assemblent, les protéines RrgA, RrgB et RrgC sont les sous-unités formant physiquement le pilus. Les trois pilines sont génétiquement construites sur le même modèle (Figure 12) :



Figure 12 : Schéma des protéines à LPxTG

Rrg : fait référence à l'une des trois pilines, RrgA, RrgB ou RrgC

LPxTG : Motif de reconnaissance aux sortases

TM : Séquence hydrophobe d'insertion membranaire

++++ : Queue cytoplasmique chargée positivement

(Hava et Camilli, 2002)

Les pilines possèdent toutes une séquence particulière appelée CWSS pour « Cell Wall Sorting Signal » en position C-terminale. Ce CWSS est composé du motif LPxTG-like propre à chaque protéine (YPRTG pour RrgA ; IPQTG pour RrgB et VPDTG pour RrgC) ainsi que d'un segment hydrophobe servant d'ancrage transmembranaire et d'une queue cytoplasmique chargée positivement (Figure 12), (Hava et Camilli, 2002). Les paragraphes suivants ont pour objectif de décrire chacune des trois pilines du pilus.

VII.1.1 La piline majeure : RrgB, 665 acides aminés

Cette protéine, comme toutes les pilines, possède un peptide signal en position amino-terminale pour être exportée jusqu'à la membrane par la voie générale de sécrétion (système

Sec). Une fois à la membrane, elle est prise en charge par une sortase spécifique puis polymérisée pour former le corps du pilus (Hilleringmann *et al.*, 2009). La polymérisation nécessite un motif particulier, le « motif- piline » présent dans RrgB entre les résidus 181 et 184 (YPKN). Ce motif, identifié en premier lieu chez *C. diphtheriae* (Ton-That *et al.*, 2003) est l'apanage des pilines majoritaires ; il inclut la lysine essentielle à la polymérisation des sous-unités de RrgB comme présenté dans le schéma de polymérisation du pilus (Figure 7). Il a été montré chez *C. diphtheriae* que la mutation de la lysine du motif piline empêchait la formation de la fibre, confirmant ainsi son caractère essentiel.

Un autre motif, présent dans RrgB est la « E-Box » dénommé ainsi du fait de la richesse en glutamates dans la séquence (Ton-That *et al.*, 2004). Ce motif est présent chez de nombreuses autres pilines de bactéries à Gram-positif et sa fonction n'est pas liée à la formation de la fibre mais à la stabilité des sous-unités pilines (El-mortaji *et al.*, 2010). L'analyse de la séquence de RrgB, révèle la présence éventuelle d'un domaine IgG-like de type Cna-B. Les domaines Cna-B sont connus pour être des domaines piédestals (Zong *et al.*, 2005), ne comportant pas de fonction particulière. En effet, la protéine Cna de *Staphylococcus aureus* est une adhésine du collagène et sa structure à haute résolution révèle la présence de deux domaines : le domaine Cna-A qui porte la fonction d'adhésion et le domaine Cna-B dont le rôle est de présenter le domaine A fonctionnel.

La structure de RrgB sous sa forme mature (sans le signal de sécrétion amino-terminal et sans le domaine transmembranaire en C-terminal) a très récemment été résolue par l'équipe du Dr Baker et montre que RrgB est composé de 4 domaines de type immunoglobulines non alignés (Figure 13), (Paterson *et al.*, 2011). Jusqu'à présent, toutes les pilines majoritaires dont la structure est connue sont formées de deux, trois ou quatre domaines IgG (ou IgG-like).

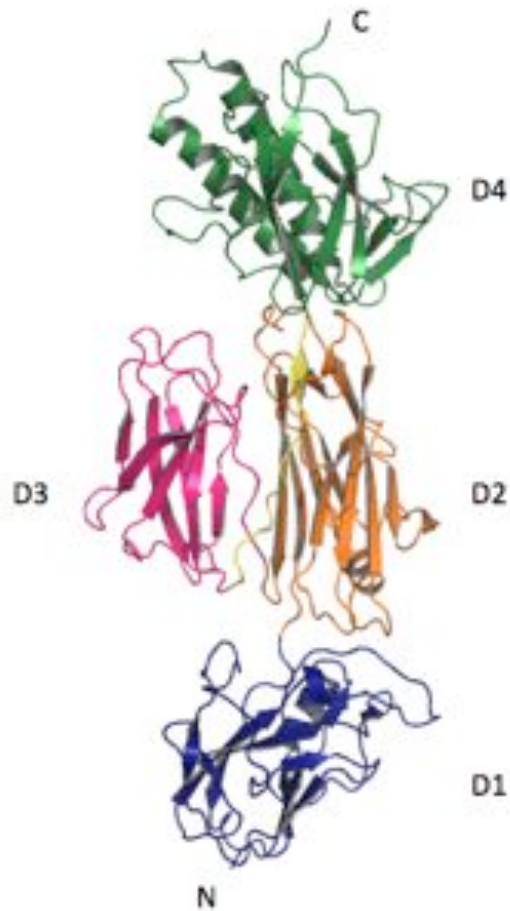


Figure 13: Structure par cristallographie aux rayons X de RrgB.

RrgB a été cristallisée sous sa forme complète, mature, comme elle le serait au sein du pilus. Quatre domaines de type IgG,Cna-B composent la structure. Le domaine D3 est excentré par rapport aux domaines D1, D2 et D4 qui sont alignés (Paterson *et al.*, 2011).

Code PDB : 3RPK

Cette structure cristallographique est en accord avec les observations précédentes par microscopie électronique qui montrent qu'au sein du pilus, RrgB possède une extrusion en forme de « nez » (Figure 14, Hilleringmann *et al.*, 2009)

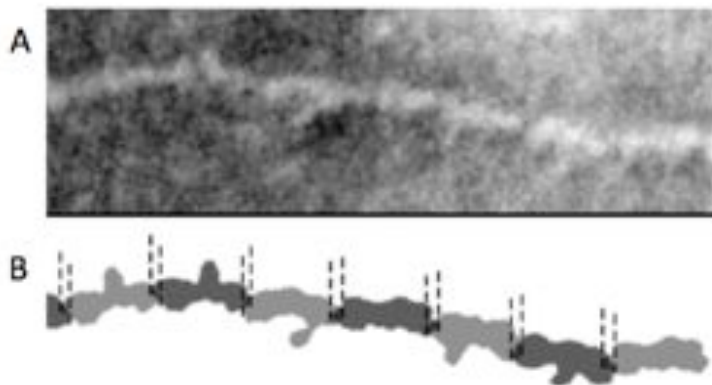


Figure 14

A. Cliché de microscopie électronique d'un pilus isolé.

B. Image modifiée de (A) faisant mieux apparaître les monomères de RrgB. Les pointillés représentent les zones de chevauchement entre les sous-unités. RrgB semble posséder des domaines non-alignés. (Hilleringmann *et al.*, 2009)

VII.1.2 La piline accessoire RrgC, 398 acides aminés

RrgC est la piline la moins bien décrite au niveau de la littérature. Sa fonction ainsi que sa structure restent à l'heure actuelle encore inconnues. Les tentatives de cristallisation ont été infructueuses et peu de résultats ressortent des études menées sur cette protéine. Cependant, des études de localisation au sein d'un pilus préalablement formé ont révélé que RrgC était localisée préférentiellement à la base de la fibre (Figure 15), lui suggérant un rôle dans la « terminaison » de la biogenèse du pilus ainsi que son ancrage à la surface de la bactérie. Cette hypothèse est appuyée par les travaux de l'équipe d'Andreas Engel qui a remarqué qu'une souche de pneumocoque $\Delta rrgC$ présentait un phénotype particulier où les pili étaient facilement détachable de la paroi bactérienne (Hilleringmann *et al.*, 2009).

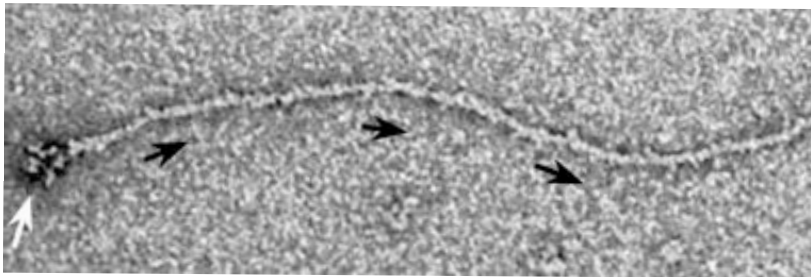


Figure 15 :
Immunolocalisation de RrgC
au sein d'un pilus isolé par
microscopie électronique.

Les flèches noires indiquent la directionnalité du pilus.
La flèche blanche indique l'anticorps anti-RrgC, localisé à la base du pilus (Hilleringmann *et al.*, 2009).

VII.1.3 L'adhésine RrgA : 893 acides aminés

RrgA est la plus grande des protéines associées à une fonction d'adhésion au sein d'un pilus. Elle est formée par près de 900 résidus et possède des homologues chez d'autres espèces de streptocoques comme par exemple *S. agalactiae* et *S. pyogenes*. De l'îlot de pathogénicité, elle est la seule à posséder un domaine fonctionnel relié à une fonction d'adhésion. En effet, le domaine « von Willebrand Factor », prédit par l'analyse de la séquence de RrgA, possède une affinité importante pour le collagène (Romijn *et al.*, 2001). De ce fait, RrgA est une protéine capitale dans la fonction d'adhésion du pilus et sa caractérisation aussi bien structurale que fonctionnelle est un enjeu majeur. La première étude visant à la caractérisation fonctionnelle de RrgA a été menée en 2007 par le groupe de B. Henriques-Normark qui a confirmé la fonction d'adhésion de RrgA (Figure 16).

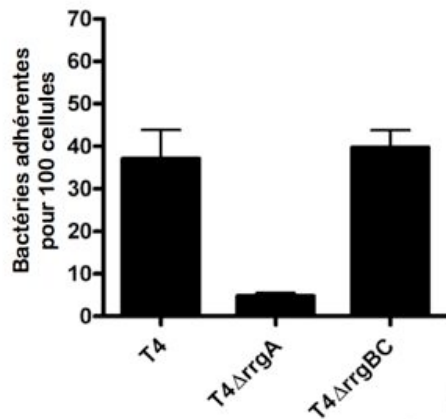


Figure 16:
Adhérence des bactéries exprimant ou pas RrgA sur des cellules de l'épithélium respiratoire humain

T4 : souche sauvage

T4ΔrrgA : souche n'exprimant pas RrgA

T4ΔrrgBC : souche n'exprimant ni RrgB, ni RrgC

(Nelson *et al.*, 2007b)

En effet, une souche délétée du gène *rrgA* possède une fonction d'adhésion extrêmement diminuée par rapport à la souche sauvage (sérotypage 4). De plus, une souche Knock-Out des gènes *rrgB* et *rrgC*, possède une affinité comparable à celle de la souche sauvage, mettant en évidence le fait que seule la protéine RrgA est responsable de cette fonction d'adhésion (Nelson *et al.*, 2007b).

Peu de temps après, il a été montré que RrgA possédait une affinité particulière pour plusieurs composants de la matrice extracellulaire : le collagène, la fibronectine et la laminine (Hilleringmann *et al.*, 2008). Le rôle de RrgA a donc été clairement défini comme étant principalement l'adhésine du pilus. Cependant une fonction de régulation de l'opéron lui a aussi été récemment attribuée. En effet, il semblerait que RrgA puisse interagir avec le régulateur RlrA et inhiber la synthèse des composants du pilus (Basset *et al.*, 2011).

La localisation de RrgA au sein de la fibre est encore un domaine mal compris. Des expériences de localisation par microscopie électronique et anticorps anti RrgA, ont permis de définir plusieurs modèles. Tour à tour, il a été montré que RrgA était localisée 1. à la base du pilus (Barocchi *et al.*, 2006), 2. en cluster tout au long de la fibre (Lemieux *et al.*, 2006), 3. au sommet de la fibre (Hilleringmann *et al.* 2008) et 4. récemment de nouveau tout le long de la fibre (El-Mortaji 2011 ; Manuscrit de thèse). Ce dernier modèle découle des expériences de caractérisation fonctionnelle des sortases par l'équipe d'Anne-Marie di Guilmi et prend en compte l'ensemble des observations disponibles et publiées à ce jour.

RrgA est une protéine très étudiée par les groupes pharmaceutiques comme Novartis, par exemple, car des études récentes prouvent l'efficacité de cette protéine dans l'immunisation contre le pneumocoque en modèle murin (Gianfaldoni *et al.*, 2007 ; Moschioni *et al.*, 2010).

VIII Objectif des travaux

Le pilus est donc un facteur de virulence très important pour la colonisation des tissus de l'hôte et est de ce fait une cible potentielle pour lutter contre les infections au pneumocoque. L'émergence de souches résistantes à une ou plusieurs classes d'antibiotiques est un problème de santé majeur et il est de plus en plus important d'étudier de nouvelles cibles thérapeutiques. Le pilus est un candidat de choix. Etant facultatif pour la bactérie, le fait d'inhiber ses propriétés d'adhésion pourrait ne pas favoriser le développement des résistances (diminution de la pression de sélection). A mon arrivée au laboratoire, le projet de caractérisation fonctionnelle et structurale des sortases du pilus était déjà bien avancé avec la thèse de C. Manzano mais peu de choses avaient été étudiées au niveau des trois pilines RrgA, RrgB et RrgC. En effet, M^{elle} Manzano avait initié des essais de cristallisation de RrgB sous forme native et sous forme sélénée mais les phases obtenues étaient de qualité trop faible pour résoudre la structure de cette protéine. Concernant RrgA, le gène été cloné dans un vecteur pLIM (Protein Expert) mais aucune expérience n'avait été encore réalisée. RrgA étant l'adhésine du pilus, mon projet était d'établir les bases structurales de la reconnaissance de la cellule hôte par cette protéine. Comme expliquée en introduction, RrgA possède une large palette de ligands potentiels mais un seul domaine fonctionnel connu pour ne lier que le collagène. Il était donc important de définir structuralement (le ou) les domaines impliqués dans le processus de reconnaissance des composants de la matrice extra-cellulaire par RrgA. L'homologie de séquence entre RrgA et plusieurs autres pilines de pathogènes humains élargie les possibilités potentielles qui découleront des travaux réalisés.

MATERIEL ET METHODES

I Biologie moléculaire

I.1 Clonage de RrgA

Le clonage de RrgA a été réalisé par Anne-Marie Di-Guilmi au Laboratoire d'Ingénierie des Macromolécules à l'IBS. L'ADN génomique de la souche « TIGR4 » de *S. pneumoniae* a été utilisé comme matrice d'amplification au cours d'une réaction de PCR. La région codante pour les acides aminés 39 à 868 de RrgA a ainsi été amplifiée puis clonée dans un vecteur d'expression pLim (Protein Expert, Grenoble). Cette construction permet l'obtention de protéines solubles en s'affranchissant du peptide signal d'export membranaire en position amino-terminale ainsi que d'une courte région d'ancrage membranaire en position carboxy-terminale. Ce plasmide, portant un gène de résistance à l'ampicilline, possède une séquence codante pour une étiquette hexahistidine en N-terminal, clivable par la protéase TEV (Tobacco Etch Virus). Des souches d'expression *Escherichia coli* BL21(DE3)-RIL portant la résistance au chloramphénicol, ont ensuite été transformées par le vecteur pLim en vue de l'expression de la protéine.

II Biochimie

II.1 Surexpression de la protéine RrgA

Une culture de cellules BL21-(DE3)-RIL en milieu TB (Terrific Broth) supplémenté de 100 µg/mL d'ampicilline (Euromedex) et de 34 µg/ml de chloramphénicol (Euromedex), est préparée en diluant une préculture à saturation au 1/20^{ème}. La croissance des bactéries est faite à 37°C sous agitation (200 rpm) jusqu'à ce que la culture atteigne une DO_{600nm}=0,6 U.A. L'expression de la protéine est alors induite par ajout de 1mM d'IPTG (Euromedex). Après 3 heures d'induction à 37°C, la culture est centrifugée à 4500 rpm pendant 30 minutes. Le culot bactérien est repris dans du tampon de lyse (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 8,0, 20 mM Imidazole). Après ajout de 1 mM de PMSF, 1 µM de pepstatine, 1 µM de leupeptine et 0,2 µM d'aprotinine, les cellules sont lysées par sonication (2 minutes de sonication par pulses de 2 secondes espacés de 10 secondes). Le lysat bactérien obtenu est ensuite centrifugé à 18000 rpm pendant 45 minutes afin de séparer les protéines solubles du matériel insoluble.

II.2 Purification

II.2.1 Chromatographie d'affinité

Le surnageant, contenant les protéines solubles est chargé sur une colonne HisTrap (GE Healthcare) préalablement équilibrée avec le tampon de lyse. Après un lavage équivalant à 20 volumes de résine avec du tampon de lyse, RrgA est éluée par un gradient en plusieurs paliers de 50, 150, 250 et 500 mM d'imidazole. Le contenu de chaque fraction d'élution est ensuite analysé sur gel SDS.

II.2.1.1 Clivage de l'étiquette hexa-histidine

Les fractions contenant RrgA sont dialysées 3 heures à 4°C dans 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 8,0 puis incubées toute la nuit en présence de protéase TEV à un ratio 1 : 5 (TEV : RrgA). A la fin de la réaction, l'activité de la protéase est inhibée par 1mM PMSF. Les protéines sont ensuite rechargées sur colonne HisTrap, et celles dont l'étiquette a correctement été clivée ne se lient pas à la colonne et se retrouve dans la fraction non-retenue.

II.2.2 Chromatographie échangeuse d'anions

Après le clivage de l'étiquette histidine, RrgA est de nouveau dialysée dans 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 puis chargée sur une colonne MonoQ (5/50 GL, GE Healthcare) préalablement équilibrée dans ce même tampon. RrgA ne se lie pas à la colonne et est éluée dans la fraction non-retenue.

II.2.3 Chromatographie de filtration sur gel

A la suite de la colonne échangeuse d'anions, la protéine est concentrée puis injectée sur colonne de filtration sur gel HiLoad 16/60 Superdex 200 (GE Healthcare) équilibrée dans le tampon 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 8,0.

II.3 Production de protéines sélénées

Une préculture en milieu LB est menée à saturation. Après centrifugation 15 minutes à 3500 rpm, le culot est lavé avec du milieu minimum M9 puis réutilisé pour ensemercer une deuxième préculture dans le milieu M9. Cette nouvelle préculture est ensuite diluée au 1/20^{ème}

pour ensemer la culture finale sous agitation à 37°C. Lorsque la culture atteint une $DO_{600nm}=0,4$ U.A, les acides aminés sont ajoutés à la culture dans les proportions suivantes : Lysine, phénylalanine, thréonine = 100 mg/litre ; Isoleucine, leucine, valine = 50 mg/litre ; Sélénio-méthionine = 60 mg/litre. Tous les acides aminés doivent avoir une conformation « lévogyre » et sont ajoutés en poudre directement dans l'ermeneyer de culture. Lorsque la culture atteint $DO_{600nm}=0,6$ U.A, l'expression de la protéine est induite par 1 mM d'IPTG pendant 12 heures à 20°C. La lyse et la purification sont identiques à la protéine native sauf concernant la dernière étape de filtration sur gel où le tampon est : 50mM HEPES, 150mM NaCl, pH 7,5.

III Méthodes Biophysiques

III.1 Etude de la thermo-stabilité des protéines : Thermal Shift Assay (TSA)

III.1.1 Principe et objectif de la méthode

La mesure de la température de fusion (T_m) d'une protéine, c'est-à-dire la température autour de laquelle la protéine perd sa structure tridimensionnelle, est un indicateur de sa stabilité. En effet, plus une protéine est stable plus sa température de fusion est élevée. L'étude de la déstructuration thermique des protéines permet donc d'obtenir des informations sur leur stabilité. C'est le principe du Thermal Shift Assay (TSA).

Le TSA peut être utilisé pour obtenir différentes informations comme par exemple comparer la stabilité de plusieurs mutants (ce qui a été fait pour RrgA) ou bien rechercher dans quelles conditions une protéine est la plus stable (pH, tampons, [NaCl]...) en vue d'expériences de cristallogénèse. La récente revue de Phillips et Hernandez de la Pena explique de manière détaillée comment mettre en œuvre cette technique (Phillips et Hernandez de la Pena, 2011). Cette technique consiste à mélanger l'échantillon protéique avec un fluorophore, le Sypro Orange (Molecular Probes) qui ne fluoresce qu'en présence d'un environnement hydrophobe. Si à basse température, la protéine est correctement repliée, les acides aminés hydrophobes sont enfouis et ne sont pas accessibles au fluorophore. La mesure de la fluorescence est donc très basse. L'échantillon est progressivement chauffé, à raison de 1 degré par minute, et le niveau de fluorescence est constamment mesuré. Lorsque la température atteint le T_m de la protéine d'intérêt, la structure n'est plus conservée, les acides aminés hydrophobes sont alors accessibles au fluorophore. Alors en présence d'un environnement hydrophobe, la sonde

fluoresce intensément et permet donc d'obtenir une cinétique de dénaturation de la protéine (comme schématisé ci-dessous en haut).

Afin de faciliter la lecture du T_m de la protéine d'intérêt, il convient de calculer la dérivée de la mesure de la fluorescence en fonction de la température (Figure 17).

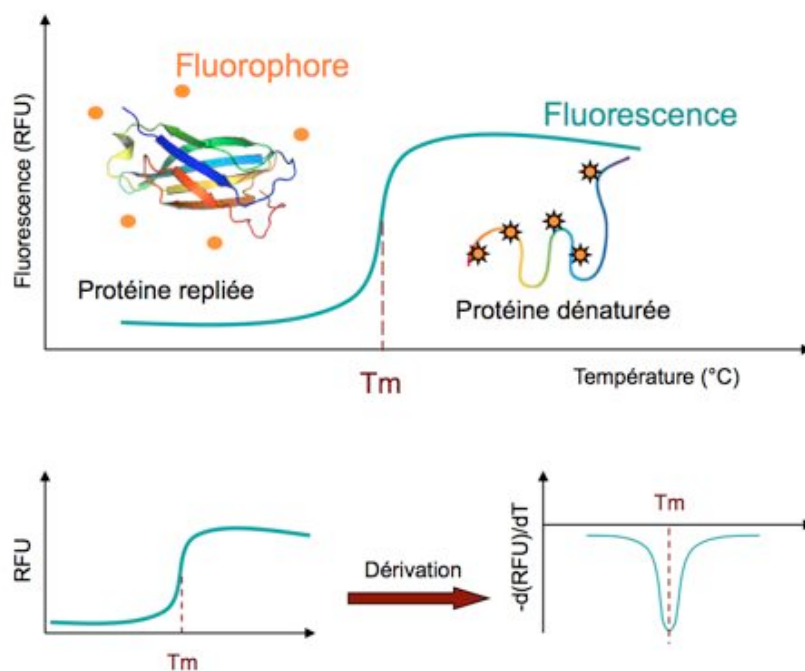


Figure 17 :
Dénaturation thermique

A basse température, une protéine est incubée avec un fluorophore spécifique des résidus hydrophobes. L'augmentation constante de la température entraîne une déstabilisation de la protéine et l'accès du fluorophore aux résidus hydrophobes.

La cinétique de fluorescence permet l'obtention de la température de fusion de la protéine.

Les expériences de TSA sont réalisées au Laboratoire d'Ingénierie des Macromolécules de l'IBS sur un appareil de PCR en temps réel de type IQ5 commercialisé par Bio-Rad.

L'analyse est effectuée en plaque 96 puis sur un volume de 25 μ l total (23 μ l de protéine à 1 ng / μ l et 2 μ l de Sypro Orange 100x). Chaque expérience est réalisée en triplicata.

III.2 Cristallographie aux rayons X

III.2.1 Introduction

L'obtention de la structure d'une protéine par cristallographie aux rayons X est un processus long et empirique qui nécessite parfois plusieurs années de recherche pour arriver à son but. Le prérequis à cette technique est l'obtention d'un échantillon protéique d'une grande pureté et homogénéité. Lorsque l'échantillon est suffisamment pur, l'obtention de cristaux est alors possible. La cristallisation de l'échantillon est soumise à de très nombreux paramètres et

est souvent l'étape limitante. L'empilement cristallin doit être extrêmement régulier et le cristal doit atteindre une taille relativement importante ($>20\mu\text{m}$) pour générer un profil de diffraction à haute résolution. Pendant l'enregistrement des données au cours d'une expérience de diffraction, les informations de phase des faisceaux diffractés sont perdues. Le phasage est alors une étape essentielle à l'obtention d'une carte de densité et de la structure de la protéine d'intérêt. La figure suivante, permet de résumer l'ensemble des étapes menant d'une protéine soluble à la résolution de sa structure (Figure 18).



Figure 18
Représentation des différentes étapes menant d'une protéine en solution à la résolution de sa structure par cristallographie aux rayons X

En rouge : les étapes principales et essentielles du processus

III.2.2 Anatomie d'un cristal

Un cristal est un arrangement d'atomes ou de molécules organisés de façon périodique dans les trois dimensions de l'espace. Pour décrire un cristal, on détermine une unité de base appelée la maille (figure 19). La maille étant caractérisée par 3 vecteurs **a**, **b**, **c** ainsi que trois angles α , β , et γ , on peut reconstruire l'ensemble du cristal par la relation de translation suivante :

$$\vec{t} = m\vec{a} + n\vec{b} + p\vec{c}$$

avec m, n et p, des nombres entiers.

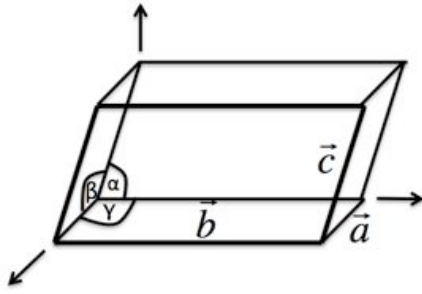


Figure 19
Représentation schématique d'une maille.

Elle est définie par 3 vecteurs et 3 angles

La translation de la maille crée le réseau cristallin au sein duquel chaque nœud équivalant du réseau possède un environnement totalement identique.

Au sein du cristal, les protéines ne sont pas empilées de manière compacte et une proportion non négligeable du volume du cristal est occupée par des canaux de solvants. Cette proportion peut être calculée à partir du coefficient de Matthews V_m (Matthews, 1968).

$$V_m = \frac{\text{Volume_de_la_maille_}(A^3)}{\text{Poids_de_la_maille_}(Da)}$$

Le V_m est typiquement compris entre 1.66 et 4. A partir du V_m , le pourcentage de solvant (%S) s'écrit :

$$\%S = 1 - \frac{1.23}{V_m}$$

D'une façon générale, le pourcentage de solvant est compris entre 30 et 75%. La connaissance du pourcentage de solvant peut renseigner sur la composition de la maille (une molécule, deux molécules ...) et peut aider au phasage par la méthode de remplacement moléculaire. Cette forte proportion de solvant rend les cristaux de protéines extrêmement fragiles et difficiles à manipuler.

III.2.3 Cristallogénèse :

En simplifiant, l'obtention d'un cristal de protéines repose sur les mêmes principes physicochimiques que l'obtention de cristaux de sel dans les marais salants. En effet, le but est d'emmener un échantillon de protéines solubles et concentrées dans un état instable (dit métastable) dans lequel la concentration protéique dépasse son seuil de solubilité. Cette

instabilité, peut potentiellement induire l'association des molécules entre-elles et la formation d'un empilement ordonné : C'est la formation du germe cristallin. A partir de ce motif, le cristal va croître et se développer en intégrant les protéines solubles. Il existe plusieurs méthodes pour obtenir la formation d'un germe cristallin. Au laboratoire nous utilisons la technique de la goutte suspendue, qui est une des techniques les plus employées.

III.2.3.1 Technique de la goutte suspendue

La technique de cristallisation utilisée au laboratoire est la technique de diffusion de vapeur en goutte suspendue. Une goutte composée d'un volume de solution protéique (1 μ l en général) et d'un volume de solution d'agent précipitant est déposée sur une lamelle rendue hydrophobe. La lamelle est ensuite retournée et scellée par un joint de graisse au-dessus d'un réservoir (1 ml) contenant la solution d'agent précipitant, formant ainsi un système clos. Le volume d'agent précipitant contenu dans le réservoir, considéré comme infini devant le volume de la goutte suspendue, dicte les conditions d'équilibre. L'équilibration des potentiels chimiques des deux solutions entraîne une diffusion des espèces volatiles (eau et alcool principalement) du site le moins concentré vers le plus concentré (généralement de la goutte vers le réservoir pour l'eau). La vitesse d'équilibration dépend de très nombreux facteurs et notamment de la température et des concentrations relatives d'agent précipitant. Au fur et à mesure que l'équilibration a lieu, l'eau contenue dans la goutte rejoint le réservoir sous forme de vapeur. Ceci a pour but de « concentrer » la protéine et l'agent précipitant au sein de la goutte, diminuant ainsi la solubilité de cette dernière. Dans certain cas, la zone de sursaturation (métastable) est atteinte et un cristal peut apparaître comme expliqué précédemment. La figure ci-dessus (Figure 20) montre un schéma de cette technique.

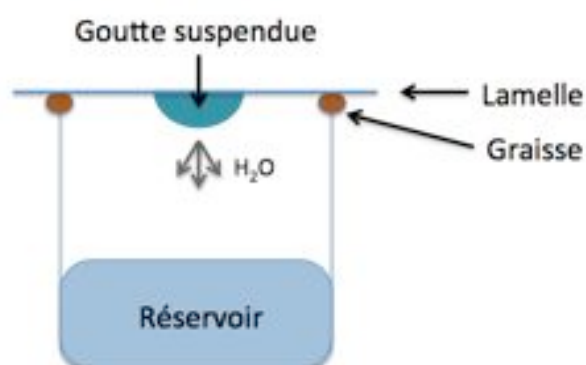


Figure 20:
Représentation schématique de la technique de la goutte suspendue

Au laboratoire, les tests de cristallisation initiaux (Température, pH, tampon et agents précipitants) sont réalisés par un nano-robot au sein du HTXlab au PSB de Grenoble. Cet instrument permet de tester rapidement près de 600 conditions. Les conditions les plus prometteuses sont ensuite affinées manuellement en vue d'obtenir un monocristal de taille suffisante pour les tests de diffraction aux rayons X.

Une fois après avoir obtenu un cristal potentiellement intéressant, il convient de le tester pour la diffraction des rayons X.

III.2.4 Diffraction des rayons X

III.2.4.1 Génération du rayonnement X

L'enregistrement de données de diffraction est soumis à l'utilisation d'une source de rayonnement x qui peut être de deux types. La première, disponible au laboratoire, est un générateur à anode tournante. Dans ce cas, un filament de tungstène (la cathode) est chauffé créant ainsi des électrons. Ces électrons sont accélérés sous l'effet d'une différence de potentiel importante et viennent percuter une anode (de cuivre généralement) en produisant un rayonnement X caractéristique (Figure 21). Au laboratoire, la longueur d'onde sélectionnée par un monochromateur correspond à la raie $K\alpha$ du cuivre (1,5418 Å).

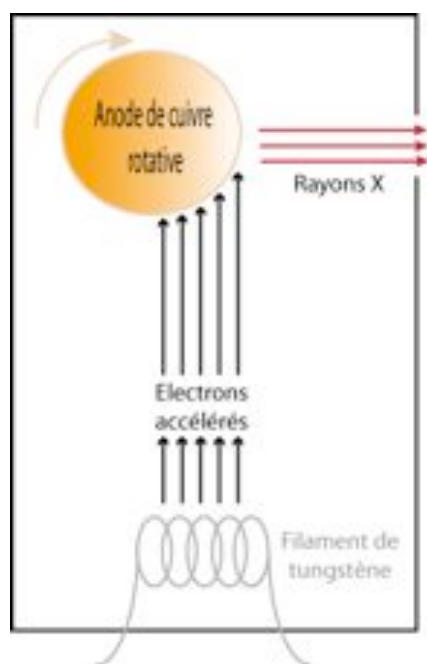


Figure 21: Générateur de rayons X

Un filament de Tungstène est chauffé, générant ainsi des électrons qui vont bombarder une anode de cuivre tournante. Cela à pour effet de créer des rayons X.

Peu intense, cette source de rayons X permet en général de tester la diffraction des cristaux avant une collecte de données au synchrotron. Cependant pour des cristaux de grande qualité (gros cristaux tridimensionnels, diffraction à haute résolution) il est possible d'enregistrer un jeu de données complet.

La seconde source de rayons X à notre disposition est le rayonnement synchrotron. À Grenoble, l'ESRF (European Synchrotron Radiation Facility) produit un rayonnement parmi les plus brillants du monde (Figure 22).

Dans un synchrotron, des électrons sont produits puis accélérés dans un Linac (Linear Accelerator) puis dans un anneau d'accélération (Booster synchrotron). Ces particules sont ensuite injectées dans l'anneau de stockage au sein duquel elles voyagent sous vide à une vitesse proche de celle de la lumière. Le rayonnement synchrotron est obtenu lorsqu'un aimant (Bending Magnet) dévie les particules de leur trajectoire, créant ainsi un rayonnement X polychromatique. Au sein de la ligne de lumière, une cabine optique équipée de monochromateurs permet de sélectionner la longueur d'onde optimale pour l'expérience.

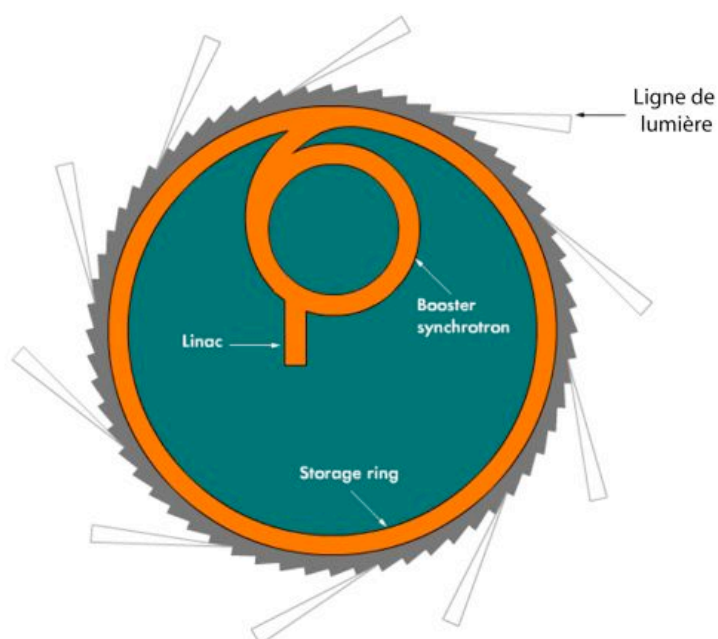


Figure 22:
Architecture d'un synchrotron

Un synchrotron est formé de 4 parties :

Le Linac : accélérateur linéaire

Le booster : accélérateur circulaire

L'anneau de stockage et la ligne de lumière
(www.esrf.eu)

III.2.5 Conditions de diffraction : la loi de Bragg

La loi de Bragg a été découverte en 1915 par Henri et Lawrence Bragg (père et fils).

Ces deux physiciens australiens ont travaillé sur l'hypothèse qu'un cristal pouvait être défini comme un ensemble de plans réticulaires (c'est à dire arrangés en réseau, parallèles) sur lesquels un faisceau de rayons X peut se réfléchir, comme il le ferait sur un miroir.

Le schéma ci-dessous permet de démontrer la loi de Bragg (Figure 23).

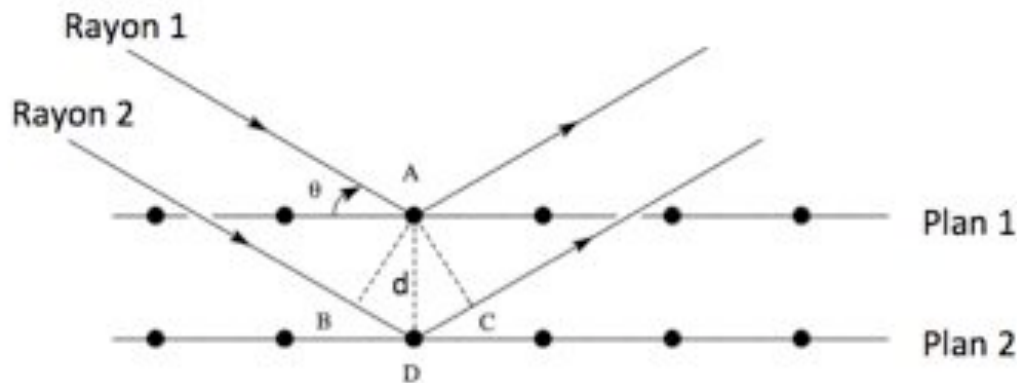


Figure 23: Schéma de réflexion de deux rayons se réfléchissant sur deux plans différents.

Soit deux ondes (Rayon 1 et Rayon 2) se réfléchissant chacune sur deux plans différents (Plan 1 et Plan 2) séparés d'une distance d .

La « différence de marche δ », c'est à dire la différence de trajet parcouru par le Rayon 2 par rapport au Rayon 1 vaut :

$$\delta = BD + DC \text{ (équation 1)}$$

Cependant, par construction,

$$BD = DC = d \sin \theta \text{ (équation 2)}$$

Donc d'après les équations 1 et 2 , on obtient que la différence de marche pour toutes constructions est défini par :

$$\delta = 2d \sin \theta \text{ (équation 3)}$$

Il ne peut y avoir diffraction que lorsque les ondes réfléchies sont en phase (interférences constructives), autrement dit lorsque que la différence de marche δ est égale à un multiple de

la longueur d'onde (λ). Ceci nous emmène directement à écrire la relation formulée par Bragg :

Si un faisceau de longueur d'onde « λ » frappe une famille de plans réticulaires de distance d'espacement « d » avec un angle « θ » alors il y a diffraction seulement si la condition suivante est respectée :

$$2d \sin \theta = n\lambda \text{ (avec } n \text{ un nombre entier)}$$

Si cette équation est satisfaite, alors les ondes vont s'ajouter et une tache de diffraction apparaîtra sur le détecteur au moment de la collecte des données.

En cristallographie, chaque nœud du réseau cristallin possède un indice de Miller (h,k,l) qui permet de l'identifier au sein du réseau. Une famille de plans parallèle sera donc définie par les indices (h,k,l). Lors de l'acquisition des données, chaque tache de diffraction (ou réflexion) issue d'une famille de plans aura donc les coordonnées (h, k, l).

III.2.6 La carte de densité électronique

Le but du cristallographe est d'obtenir la carte de densité électronique $\rho(x,y,z)$ de la structure qu'il souhaite résoudre. En tout point (x, y, z) de la maille, la carte de densité électronique est définie comme étant :

$$\rho_{(x,y,z)} = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l F_{(h,k,l)} e^{-2\pi \cdot i(hx+ky+lz)}$$

avec V le volume de la maille, $F_{(h,k,l)}$ le facteur de structure de l'onde diffractée et x, y et z les coordonnées réduites d'une position au sein de la maille.

Le facteur de structure $F_{(h,k,l)}$ est défini tel que :

$$F_{(h,k,l)} = \sum_j f_{(j)} e^{2\pi \cdot i(hx(j)+ky(j)+lz(j))} = |F_{hkl}| e^{i\varphi_{hkl}}$$

avec $f(j)$ le facteur de diffusion de chaque atome de la maille.

De cette équation, on voit que $F_{(h,k,l)}$ est composé d'une information de phase (φ_{hkl}) et d'une information d'intensité $|F_{(h,k,l)}|$. En effet, $|F_{(h,k,l)}|$ qui est l'amplitude de l'onde est directement proportionnel à la racine carrée de l'intensité.

Malheureusement, au cours d'une expérience de diffraction des rayons X, l'information de phase n'est pas enregistrée et celle-ci est perdue, empêchant la résolution de l'équation de la densité électronique et donc la résolution de la structure de la protéine d'intérêt.

Il existe cependant deux méthodes fréquemment utilisées pour retrouver l'information de phase manquante. Il s'agit de la diffusion anormale et du remplacement moléculaire.

III.2.6.1 La diffusion anormale

Lorsque un cristal de protéine est soumis à un flux de rayons X de longueur d'onde (donc d'énergie) correspondante au seuil d'absorption d'un atome lourd (un métal par exemple), il y a alors absorption du rayon incident par les électrons des couches profondes de l'atome lourd concerné. Cette absorption se traduit par la transition des électrons d'une couche basale à une couche supérieure (état d'excitation). Ainsi, le rayonnement diffracté par l'atome lourd possède une phase différente par rapport aux autres rayonnements diffractés et son facteur de structure, devant tenir compte de ce déphasage, devient complexe et s'écrit :

$$f = f_0 + f'(\lambda) + if''(\lambda)$$

f_0 est indépendant de la longueur d'onde utilisée contrairement à f' et f'' . Au moment de l'expérience, la longueur d'onde optimale pour laquelle les contributions de f' et f'' au facteur de structure sont maximales, sera déterminée. Le terme $f'(\lambda)$ est en phase avec f_0 mais du fait de sa composante imaginaire f'' possède un décalage de phase de 90° .

Ceci induit le nom respect de la loi de Friedel, les réflexions normalement équivalentes ne le sont plus et $F_{(h,k,l)} \neq F_{(-h,-k,-l)}$ comme on peut le voir sur le diagramme d'Argand suivant :

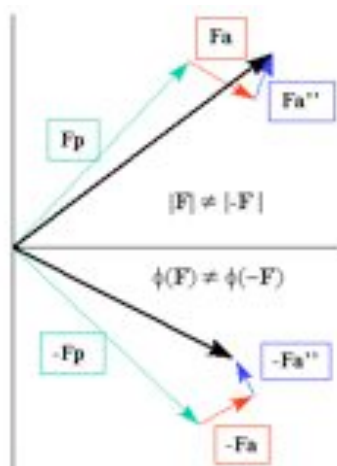


Figure 24 :
Diagramme d'Argand montrant l'effet d'un diffuseur anormal sur le facteur de structure F.

Le non-respect de la loi de Friedel (car $|F| \neq |-F|$) permet de décrire une fonction appelée différence anormale :

$$\Delta|F|_{ano} = (|F(+)| - |F(-)|) \frac{f'}{2f''}$$

Cette différence anormale permet de calculer une carte de Patterson anormale. Ceci a pour but de déterminer la position des diffuseurs anormaux au sein de la maille puis d'approximer par la suite la position de l'ensemble des atomes de la protéine.

III.2.6.2 Remplacement Moléculaire

Le principe du remplacement moléculaire repose sur l'utilisation des phases d'un modèle possédant une forte identité de séquence (en général supérieure à 30%) avec la protéine d'intérêt afin d'en résoudre les facteurs de structure et ainsi obtenir une carte de densité électronique de la protéine. Cette première carte résultera des intensités mesurées au cours de l'expérience de diffraction mais aussi des phases d'un modèle homologue.

Pour cela, les fonctions de Patterson sont calculées pour la protéine d'intérêt et pour le modèle. Les cartes de Patterson résultantes seront comparées et orientées suivant 3 angles de l'espace (appelés les angles d'Euler) afin de maximiser le nombre de pics superposés correspondant aux vecteurs intramoléculaires. Ceci représente la fonction de rotation. La deuxième étape est la fonction de translation. Au cours de cette étape, les cartes de Patterson contenant les corrélations des vecteurs intermoléculaires sont à leur tour superposées et 3 vecteurs sont alors définis. Ces 3 angles et 3 vecteurs permettent de positionner le modèle au sein de la maille de la protéine d'intérêt.

La suite de programmes CCP4 (CCP4, 1994) possède de nombreux outils pour obtenir des phases par remplacement moléculaire. Au laboratoire nous utilisons principalement le programme PHASER (McCoy *et al.*, 2007).

Cette technique très rapide possède cependant quelques inconvénients. En effet la première difficulté est de connaître un modèle possédant une forte homologie avec la protéine d'intérêt. La deuxième difficulté réside dans le fait que l'information de phase issue du modèle biaise

considérablement la structure de la protéine d'intérêt comme on peut le voir sur l'explication suivante :

Soit le canard et le chat deux objets :



Illustrations issues du livre
de Kevin Cowtan

Si nous utilisons les informations de phases issues de la transformée de Fourier du canard et les amplitudes du chat (ce qui peut être assimilé à un remplacement moléculaire), l'objet reconstitué est le suivant :



Illustration issue du livre de
Kevin Cowtan

Comme on peut le voir, les phases jouent un rôle majeur dans l'information structurale. Cet exemple met en évidence le biais que peut apporter le modèle à la structure d'intérêt et donc la nécessité d'affiner la structure afin que celle-ci reflète au maximum la réalité.

III.3 Construction et affinement du modèle

Le modèle construit initialement ne permet pas toujours d'expliquer l'ensemble des informations structurales observées. Il est donc nécessaire de l'affiner. L'affinement a pour but de modifier le modèle pour que celui-ci explique de manière la plus réelle possible les informations structurales issues de l'expérience.

Deux paramètres principaux permettent de suivre l'affinement du modèle, il s'agit des facteurs R et R_{free} . Mathématiquement, ces deux facteurs sont définis de manières identiques et peuvent s'écrire :

$$R = R_{\text{free}} = \frac{\sum_{hkl} \left| |F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}| \right|}{\sum_{hkl} |F_{\text{obs}}|}$$

Où F représente le facteur de structure.

La différence entre le facteur R et le facteur R_{free} réside dans le nombre de réflexions utilisées pour le calcul. En effet, le facteur R_{free} est calculé avec 5% des réflexions qui ne seront pas affinées. De ce fait, une diminution du facteur R non corrélées à une diminution du facteur

R_{free} rend compte d'un sur affinement qui entraîne des erreurs au niveau de la structure finale du modèle.

Pendant l'affinement, les coordonnées x , y et z ainsi que le facteur d'agitation thermique B sont modifiés pour chaque atome de manière à expliquer le mieux possible la carte de densité électronique tout en respectant les contraintes géométriques imposées pour toutes protéines (ou molécules de solvant). En pratique l'affinement est réalisé par cycles au cours desquels le modèle est modifié manuellement puis soumis à un affinement numérique via les programmes COOT (Emsley et Cowtan, 2004) et REFMAC (Murshudov *et al.*, 1997), respectivement.

III.4 Cristallogénèse et Collecte des données

III.4.1 Cristallogénèse

La cristallisation de RrgA est réalisée par la méthode de la goutte suspendue à 20°C. Les nombreuses conditions obtenues au Laboratoire de Cristallisation à Haut Débit du PSB (HTXLab) ont été affinées manuellement jusqu'à l'obtention de monocristaux de taille suffisante pour des expériences de diffractions des rayons X. L'affinement est réalisé en mixant 1µl de protéine concentrée à 1µl d'agent précipitant. Un gradient d'agent précipitant est réalisé sur plaque 24 puis pour isoler la condition optimale. Sous sa forme native l'obtention de cristaux de RrgA est réalisée à 6mg/ml dans 20% PEG 3350 ; 0,2M disodium phosphate dihydrate. Sous sa forme dérivée sélénométhionine, les cristaux sont obtenus à 20 mg/ml dans 50mM MES (pH 6,5) ; 5% PEG 4000 ; 10% glycerol et 100mM NaCl.

III.4.2 Collecte des données

Une fois les cristaux obtenus, il est nécessaire de les cryo-protéger avant la collecte. En effet, la collecte du jeu de données se fait à 100°K sous un flux d'azote gazeux afin de limiter les effets de la chaleur produite par l'interaction entre les molécules du cristal et le faisceau de rayons X. Sans cryoprotection, les molécules d'eau contenues dans les canaux de solvant vont former de la glace, ce qui doit être évité pour deux raisons. La glace étant un empilement cristallin de molécules d'eau, va considérablement bruite le jeu de données et peut rendre difficile son traitement. D'autre part, elle occupe un volume plus grand que l'eau liquide et peut, de ce fait, détruire l'empilement cristallin protéique lors de sa formation. Pour palier à ce problème, le cristal doit être cryo-protégé. Pour se faire, il est successivement

trempé dans une solution de concentration croissante en glycérol (5, 10, 15, 20 et 25%), ce qui va empêcher la formation de glace ordonnée.

Un premier jeu de données natif a été enregistré sur la ligne de lumière ID23-EH1 de l'ESRF. Une expérience MAD (Multiple-wavelength Anomalous Dispersion) fut ensuite enregistrée sur la ligne de lumière ID29, permettant de modifier les longueurs d'onde pendant l'expérience. Un spectre de fluorescence, au seuil d'absorption du sélénium, a été enregistré sur un cristal de RrgA sélénée. Ce spectre permet de déterminer les variations des coefficients f' et f'' en fonction des variations de l'énergie des photons incidents. La longueur d'onde correspondant au seuil d'absorption du sélénium pour laquelle la valeur de f'' est maximale a été choisie comme longueur d'onde du pic à 0,9790 Å (12,664 keV). La seconde longueur d'onde utilisée appelée « inflection » correspond au minimum de f' à 0,9790 Å (12,662 keV). Une troisième ainsi qu'une quatrième longueur d'onde de référence ont été choisies à 0,9751 Å (12,640 keV) et 0,9880 Å (12,714 keV).

La structure de RrgA a finalement été résolue par SAD en utilisant le jeu de données collecté au pic du sélénium grâce au programme AutoSharp. Le modèle initial obtenu à 2,4 Å de résolution a été utilisé pour phaser un jeu de donnée natif à 1,9 Å en utilisant le programme PHASER. La maille est composée d'une seule molécule d'RrgA et de deux molécules d'HEPES. Les facteurs R et R_{free} sont respectivement 19,80 et 23,80 en fin d'affinement.

RESULTATS

I RrgA : résumé de l'article

Les pili sont des facteurs de virulence ancrés à la surface des bactéries et jouant un rôle important dans la reconnaissance et l'adhésion aux cellules hôtes. La protéine RrgA, portée par le pathogène *Streptococcus pneumoniae*, est un élément important pour l'établissement de l'infection par un nombre de souches non négligeable. Dans cet article, nous présentons la structure à haute résolution par cristallographie aux rayons X de RrgA. Cette protéine de 893 résidus se structure en 4 domaines alignés, d'origines eucaryote et procaryote. En effet, RrgA possède un domaine de reconnaissance du collagène de type intégrine I, lequel est modifié par deux insertions qui forment une cavité chargée positivement. Les trois autres domaines, d'origine procaryote, ne possèdent pas d'activité d'adhésion mais forment un piédestal au bout duquel se situe le domaine fonctionnel. Nous avons montré par spectrométrie de masse, mutagenèse dirigée et expériences de dénaturation thermique que la présence de ponts isopeptidiques au sein de la protéine jouait un rôle important dans la stabilisation de l'ensemble de la structure.



Structural Basis of Host Cell Recognition by the Pilus Adhesin from *Streptococcus pneumoniae*

Thierry Izoré,¹ Carlos Contreras-Martel,¹ Lamya El Mortaji,¹ Clothilde Manzano,¹ Rémy Terrasse,¹ Thierry Vernet,¹ Anne Marie Di Guilmi,^{1,*} and Andréa Dessen^{1,*}

¹Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel, UMR 5075 (CEA, CNRS, UJ F); 41 rue Jules Horowitz, F-38027 Grenoble, France

*Correspondence: diguilmi@ibs.fr (A.M.D.G.), dessen@ibs.fr (A.D.)

DOI 10.1016/j.str.2009.10.019

SUMMARY

Pili are fibrous virulence factors associated directly to the bacterial surface that play critical roles in adhesion and recognition of host cell receptors. The human pathogen *Streptococcus pneumoniae* carries a single pilus-related adhesin (RrgA) that is key for infection establishment and provides protection from bacterial challenge in animal infection models, but details of these roles remain unclear. Here we report the high-resolution crystal structure of RrgA, a 893-residue elongated macromolecule whose fold contains four domains presenting both eukaryotic and prokaryotic origins. RrgA harbors an integrin I collagen-recognition domain decorated with two inserted “arms” that fold into a positively charged cradle, as well as three “stalk-forming” domains. We show by site-specific mutagenesis, mass spectrometry, and thermal shift assays that intradomain isopeptide bonds play key roles in stabilizing RrgA’s stalk. The high sequence similarity between RrgA and its homologs in other Gram-positive microorganisms suggests common strategies for ECM recognition and immune evasion.

INTRODUCTION

Pili are elongated, flexible appendages directly associated to the bacterial surface that have been shown to participate in essential events for infection establishment, including adhesion to the extracellular matrix, DNA transfer, and biofilm formation. The well-studied Gram-negative pili consist of thin fibers formed by non-covalently associated building blocks, and binding to host cells is performed by adhesins, which are often localized on the fimbrial tip. Adhesin recognition of oligosaccharides of target cell glycoproteins or glycolipid receptors determines tissue tropism and is often essential for the initial phases of the infection process (Proft and Baker, 2009; Soto and Hultgren, 1999; Telford et al., 2006). Pili in Gram-positive pathogens have only been recently described, and consist of a backbone formed by covalently linked copies of a major pilin to which minor pilins are associated. Although the minor subunits are not required for formation of the pilus shaft, they have been shown to be essential for host cell recognition and adhesion of a variety of Gram-positive microorganisms (Abbot et al., 2007; Barocchi et al., 2006;

Dramsi et al., 2006; Maisey et al., 2007; Mandlik et al., 2007; Nalaparreddy et al., 2006; Nelson et al., 2007). In addition, pilus-related adhesins of Gram-positive bacteria confer protection against a potentially lethal bacterial challenge in animal disease models (Gianfaldoni et al., 2007; Maione et al., 2005; Mora et al., 2005), underlining the importance of these molecules in pathogenesis and as well as of their potential application as antigens in vaccination strategies (Proft and Baker, 2009; Telford et al., 2006).

The Gram-positive human pathogen *Streptococcus pneumoniae* accounts for a large number of cases of pneumonia, otitis, and meningitis, and is one of the major causes of community-acquired illnesses. Despite the availability of antibiotic treatment and vaccine strategies, it still claims yearly over 1.5 million victims worldwide, mostly due to the spread of antibiotic-resistant strains and the limited efficacy of vaccines (Bronzwaer et al., 2002; Levine et al., 2006). Thirty percent of *S. pneumoniae* strains isolated in clinical environments are pilated and carry the *rtrA* genetic element, which codes for all seven genes required for pilus formation: the *rtrA* regulating element, the backbone-forming pilin (RrgB), an adhesin (RrgA), a minor pilin (RrgC), and three sortases (SrtC-1, SrtC-2, SrtC-3) (Barocchi et al., 2006; Dramsi et al., 2008; LeMieux et al., 2006). Sortases are cysteine transpeptidases that recognize cell-wall sorting signals (CWSS) such as LPXTG-like motifs on target pilins and catalyze both the covalent association of pilus backbone subunits and the association of minor pilins to the fibrillar shaft (Mandlik et al., 2008a; Scott and Zahner, 2006; Ton-That and Schneewind, 2004). Although sortases have been shown to recognize preferentially one Rrg substrate, it is now known that their specificities can be interchangeable up to a certain extent, a fact that is potentially linked to the similarity of their active sites (Fälker et al., 2008; Manzano et al., 2008; Neiers et al., 2009; Manzano et al., 2009). Immunoelectron microscopy imaging has shown that the pneumococcal backbone fiber is formed by RrgB, whereas RrgA and RrgC are associated along the filament (Barocchi et al., 2006; Hillerigmann et al., 2008; LeMieux et al., 2006).

The only adhesin of the pneumococcal pilus, RrgA, plays a key role in bacterial adhesion both to respiratory and to epithelial cells (Nelson et al., 2007); in addition, it has been shown to interact with different elements of the extracellular matrix (ECM), namely fibronectin, collagen, and laminin (Hillerigmann et al., 2008). Interestingly, however, cellular recognition by pneumococcal pili also occurs in *DrrgB**DrrgC* strains, in which the RrgB backbone is notably absent, suggesting that the adhesive properties of RrgA are effective even when it is associated directly onto the bacterial surface (Nelson et al., 2007). However,



Structure

Structure of the Pneumococcal Pilus Adhesion

Table 1. Data Collection, Phasing, Molecular Replacement, and Structure Refinement Statistics

Data Collection				
Data set	Peak	Inflection Point	Low Remote	Native
Wavelength (Å)	0.9791	0.9793	0.9751	0.9810
Space group	P2 ₁	P2 ₁	P2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
a (Å)	51.66	51.78	51.85	51.09
b (Å)	83.66	83.98	84.13	83.73
c (Å)	180.27	180.91	181.24	299.43
b (°)	89.79	89.82	89.83	
Resolution (Å)	2.41	2.41	2.41	1.90
No. observed/unique reflections	193,352/102,274	187,186/100,908	176,800/97,859	582,427/97,681
Completeness (%)	81 (60)	76.4 (50.7)	70.6 (41.8)	88.7 (64.4)
R _{sym} (last shell)	7.9 (36.3)	8.6 (59.4)	9.9 (82.4)	5.3 (35.9)
I/s(I) (last shell)	6.97 (2.13)	6.4 (1.41)	5.75 (0.97)	38.29 (5.96)
Phasing				
Phasing power ANO	0.828	0.606	0.256	
Phasing power ISO (acentric/centric)		0.104/0.109	0.192/0.189	
FOM _{obs}	0.3433			
FOM _{DM}	0.8759			
Molecular Replacement				
Phaser RFZ/TFZ				22.2/31.2
LLG				968/1090
Refinement				
Resolution (Å)				1.90
R _{work} (%)				19.80
R _{free} (%)				23.80
No. of protein atoms				6486
No. of solvent atoms				819
No. of HEPES molecules				2
Rmsd, bond lengths (Å)				0.024
Rmsd, bond angles (°)				1.890
Mean B factor (Å ²)				18.56
Residues in most favored/allowed region of Ramachandran plot (%)				98.23

neither the identity of RrgA's cellular receptor(s) nor details regarding its multifaceted mode of ECM recognition are known.

In order to address this question, we solved the high-resolution crystal structure of RrgA from the highly infectious TIGR4 pneumococcal strain. In contrast to all adhesin structures solved to date, which display compact folds of limited size, RrgA is an 893-residue, elongated molecule that harbors four domains associated semilinearly as "beads on a string." The largest domain harbors a region that displays high similarity to the collagen-binding integrin I domain, whereas the three others display folds present in other bacterial systems, namely a region reminiscent of the CnaB adhesin of *S. aureus* and two immunoglobulin (IgG-like) domains. Both CnaB-like and IgG domains are stabilized by intermolecular isopeptide bonds, which we show, by mutagenesis and thermal shift assays, to be key for RrgA stabilization. The high sequence similarity between RrgA and other streptococcal pilus adhesins suggests that its complex, multifaceted fold, which involves elements from both

eukaryotic and prokaryotic systems, will provide information regarding pilus-ECM interactions in a variety of Gram-positive pathogens.

RESULTS

RrgA, A Four-Domain Adhesin

RrgA is an 893-residue protein whose primary structure analysis predicts the presence of a von Willebrand factor-like domain and reveals an LPXTG-like CWSS at its C terminus; a construct that lacks the first 38 amino acids, predicted to be disordered, as well as the CWSS was used for crystallization. RrgA (39-868) crystallized as a monomer in space group P2₁, and the structure was solved by performing a three-wavelength anomalous dispersion (MAD) experiment on a selenomethionylated crystal at the ESRF synchrotron in Grenoble; this model was subsequently used to phase native data to 1.9 Å. Data collection, phasing, and refinement statistics are included in Table 1.



Structure

Structure of the Pneumococcal Pilus Adhesion

RrgA (residues 47-815 [Figure 1](#); see [Figure S1](#) available online) is an unusual four-domain (D1-D4), elongated molecule that is approximately 195 Å long and 70 Å wide; domains D1 and D2 carry elements from both N-terminal and C-terminal regions of RrgA into which other sequences have been inserted (domain D3 is inserted into D2; D2/D3 are inserted into D1). The four domains make few contacts with each other, being mostly associated through short linkers and hairpins, which suggests that the full-length protein, once associated to the RrgB backbone fiber, could display a considerable level of domain flexibility.

Domain D1 is highly reminiscent of an IgG domain ([Figure S2](#)). Five b strands are formed from the N terminus of the sequence (residues 47-141), whereas the last strand, which connects to D4, is formed by C-terminal residues 723-731 (dark green in [Figure 1B](#)). Domain D2 is formed by N-terminal residues 144-218 and C-terminal residues 593-722 that clasp into an 11-b-stranded sandwich (cyan and blue, [Figure 1B](#)). The two “halves” of the sandwich are locked together by an isopeptide bond between Lys191 and Asn695. Notably, the fold of D2 is reminiscent of that of the B domain of the collagen-binding adhesin Cna from *S. aureus* ([Deivanayagam et al., 2000](#)) ([Figure S2](#)); a comparison of the two structures reveals that it is mostly the core b strands that are structurally comparable, and RrgA harbors additional hairpins and loops located away from the core. The D2 domain is linked to a third, major domain (D3) through a short b-hairpin structure, itself also composed of residues from the N-terminal and C-terminal regions of the molecule (Thr214-Gln218, and Val587-Lys591).

RrgA's D3 domain (Lys219-Ile586) contains a region (yellow in [Figure 1](#)) whose fold highly resembles that of the human A3 domain of von Willebrand factor (VWA), a molecule shown to interact with collagens I and III ([Bienkowska et al., 1997](#); [Cruz et al., 1995](#)). The VWA fold is found in many eukaryotic cell surface proteins involved in interactions with the extracellular matrix ([Springer, 2006](#)), including within the b domain of integrins, where it also has been shown to play a role in collagen interaction ([Emsley et al., 2000](#); [Kamata and Takada, 1994](#); [Tuckwell et al., 1995](#)). The classical VWA/integrin I fold consists of a central, six-stranded b sheet surrounded by a helices, resembling a dinucleotide-binding domain ([Bienkowska et al., 1997](#); [Emsley et al., 2000](#); [Huizinga et al., 1997](#); [Lee et al., 1995b](#); [Qu and Leahy, 1995](#); [Vorup-Jensen et al., 2003](#)) and superposition of the structure of the a2b1 integrin onto the analogous domain in RrgA reveals high structural similarity ([Figure S2](#)) (albeit a sequence identity level that is below 10%). However, RrgA's integrin I-like domain displays a five-stranded parallel sheet and carries two main inserted “arms” ([Figure S3](#)). The first inserted region immediately follows b2 and involves residues Phe280-Asp318 (magenta in [Figure 1](#)); it folds into an elongated region carrying two b hairpins. The second, larger insertion region ranges from Met392 to Gly516 (red in [Figure 1](#)); although it is mostly composed of loops, it carries one short hairpin region and two helices. These two inserted arms extrude from the core of the integrin I-like domain and stretch out, away from the body of the molecule, making a large number of interactions throughout. Interestingly, sequence analyses and structural predictions of RrgA homologs in different pathogenic streptococcal species ([Figure 2](#)) reveal that the full-length molecules display a sequence identity level of approximately 50% (with

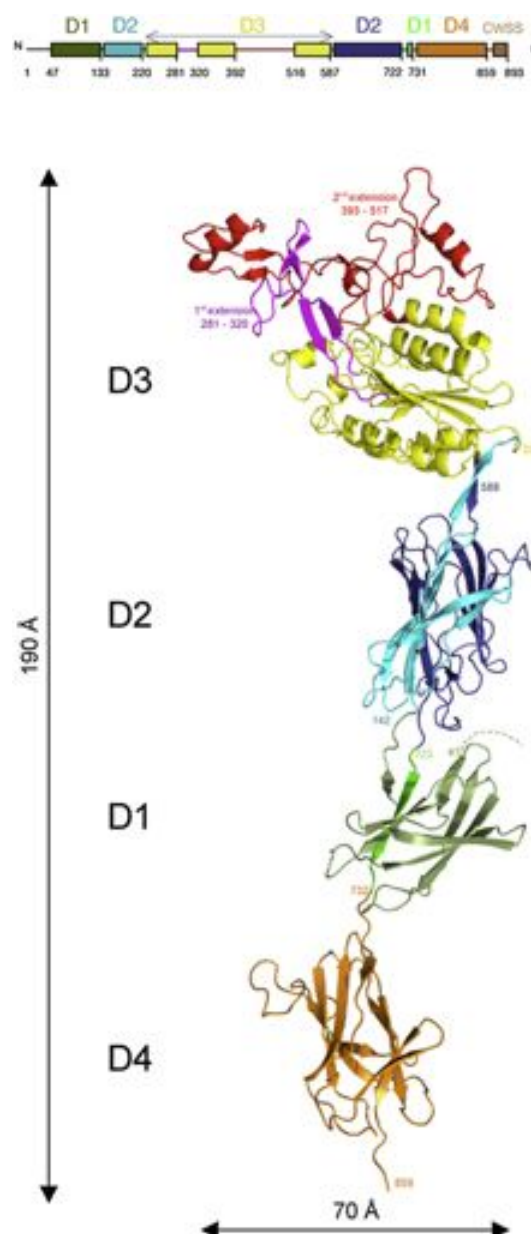


Figure 1. Schematic Arrangement and Tertiary Fold of RrgA (Top) RrgA is composed of four domains, where D3 is inserted into D2, and D2/D3 are inserted into D1.

(Bottom) In 3D, RrgA's four domains are aligned much like beads on a string; D1 is shown in dark green (N-terminal region) and light green (C-terminal strand); the Cna-B-like domain of D2 is formed by residues from the N terminus (light blue) and C terminus (dark blue) of the molecule. The integrin I-like domain is shown in yellow, with the extended arms in red and magenta. The C terminus of RrgA is composed of domain D4 (orange).

Structure

Structure of the Pneumococcal Pilus Adhesion

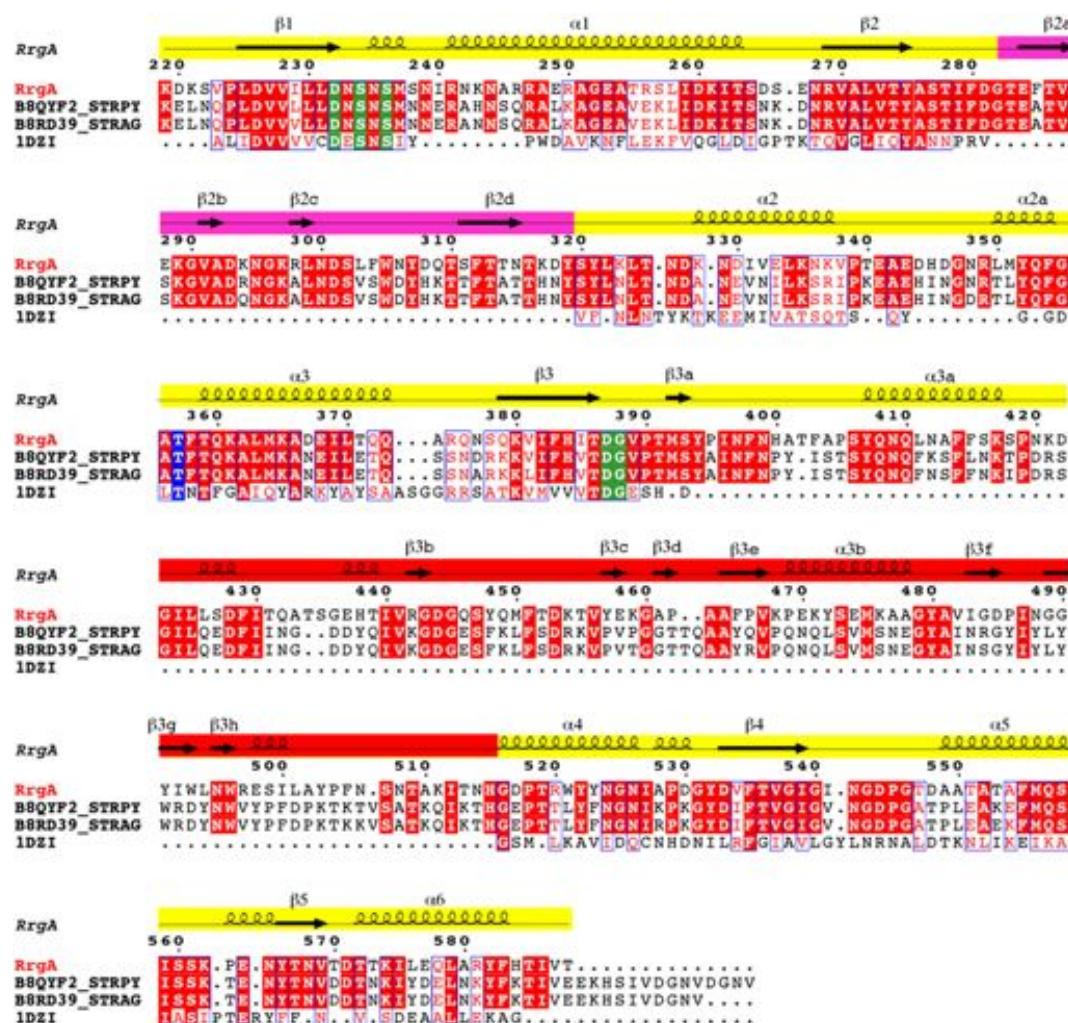


Figure 2. Streptococcal Pilus Adhesins Show Multiple Similar Structural Features

Sequence alignment of the D3 domain of RrgA with the analogous domain of the major pilus adhesins (RrgA homologs) from *Streptococcus agalactiae* (B8RD39) and *Streptococcus pyogenes* (B8QYF2), as well as the I domain of eukaryotic integrin α2β1. Identical residues are shown in white with a red background. Residues involved in the MIDAS motif are highlighted in green. Thr357, which could potentially bind the metal ion directly upon a ligand-induced conformational change, is highlighted in blue. Secondary structure elements corresponding to inserted arms are shown in magenta and red; note their clear absence in the sequence of integrin α2β1. The red arm region shows the highest level of sequence divergence.

similarity levels beyond 70%), and also harbor integrin I-like domains decorated with arms. However, it is precisely in the region of the inserted arms that the sequence identity level is the lowest (in the range of 40%); this is the most evident in the analysis of Figure 2, and suggests that this region could be employed for different roles in pathogenesis (see below).

Domain D4 (orange in Figure 1) precedes the CWSS C-terminal sequence and is separated from domain D3 through a 13-residue stretched linker region with high temperature factors (and thus flexibility). D4, like D1, is highly reminiscent of an IgG domain (Figure S2), and is composed uniquely of

C-terminal residues 736–859. IgG domains have been identified within the structure of the minor adhesin GBS52 of the pilus of *S. agalactiae*, where they have been shown to be crucial for bacterial adhesion (Krishnan et al., 2007), and is notably present in structures of adhesins associated to Gram-negative pili (Soto and Hultgren, 1999). In addition, a second isopeptide bond is present between Lys742 and Asn854 (see below).

Multiple Extracellular Matrix-Binding Platforms

Integrin I domains carry a MIDAS (metal ion-dependent adhesion site) motif located largely on the C-termini of the central b sheet.

This site is formed by an aspartate and 2 serine residues organized within a Asp-X-Ser-X-Ser sequence, as well as a Thr and a second Asp residue, and has been shown to play a key role in the recognition of collagen (Emsley et al., 2000; Kamata and Takada, 1994). The analogous region in RrgA, located within domain D3, also carries a MIDAS motif composed of the Asp232-X-Ser234-X-Ser236 constellation of residues on loop1 and one acidic residue (Asp 387) on loop 3 (Figures 2 and 3A). In addition, as is the case for integrins, the MIDAS motif of RrgA coordinates a metal ion that we have modeled here as an Mg^{+2} (although no metal was included in the crystallization solution). Ser234, Ser236, and Asp387 form direct bonds to the metal through their hydroxyl oxygen atoms, whereas Asp232 and Thr357 contribute water-mediated contacts. It is of note that integrin I domains undergo large conformational changes upon ligand binding (Springer, 2006), and the conformation of the RrgA MIDAS domain, presented here in the absence of ligand, is closed. It is of interest, however, that the high structural similarity between the D3 domain of RrgA and beta-I integrin domains, including the presence of metal within the MIDAS motif, clearly points to collagen recognition as a potential function for RrgA; interestingly, this is confirmed by the studies of Hilleringmann and colleagues (Hilleringmann et al., 2008) who identified collagen as a major target for RrgA. One notable difference between the MIDAS motif of eukaryotic integrins and pneumococcal RrgA is that in the former, the motif is located superficially, on a shallow region of the protein surface, whereas in RrgA it is positioned within an a trench-like region cradled by the two inserted arms (Figure S4). Superposition of the structure of integrin $\alpha 2 \beta 1$ in complex with a triple-stranded peptide from collagen III (PDB 1d2i) onto RrgA generated a large number of clashes (not shown), suggesting that accommodation of the collagen peptide into the trench would require localized movement of MIDAS residues, as shown for "open" conformations of many integrin I domains (Springer, 2006). Superposition of the structure of the RrgA MIDAS domain with the open and "closed" forms of the CR3 $\beta 2$ -integrin (Lee et al., 1995a) suggests that cleft opening could include movement of the Thr357 side chain, which could potentially interact directly with the metal ion in the liganded form (Figure S5). In addition, conformational changes could include movement or rotation of the arms. Such an entrenched recognition between a pilus adhesin and an ECM component could provide accrued stability to the bacterium on the matrix surface.

In addition to recognizing collagen, RrgA has also been shown to be important for *S. pneumoniae*'s recognition of laminin and fibronectin, common components of the eukaryotic extracellular matrix (ECM) (Hilleringmann et al., 2008). Glycosaminoglycans (GAGs) are linear polysaccharides attached covalently to proteins of the proteoglycan family, and are ubiquitously present on all animal cell surfaces. Interestingly, several proteins that recognize GAGs do so through elongated crevices rich in basic residues (Imberty et al., 2007). Notably, analysis of a surface potential map of RrgA reveals that the two insertion arms of D3 join on the region that is the farthest from the N and C termini of RrgA in order to form a large, cradle-shaped surface of highly basic character (Figure 4). The concentration of basic residues present in the U-shaped cradle suggests that the cradle could provide the binding site for negatively charged molecules (such

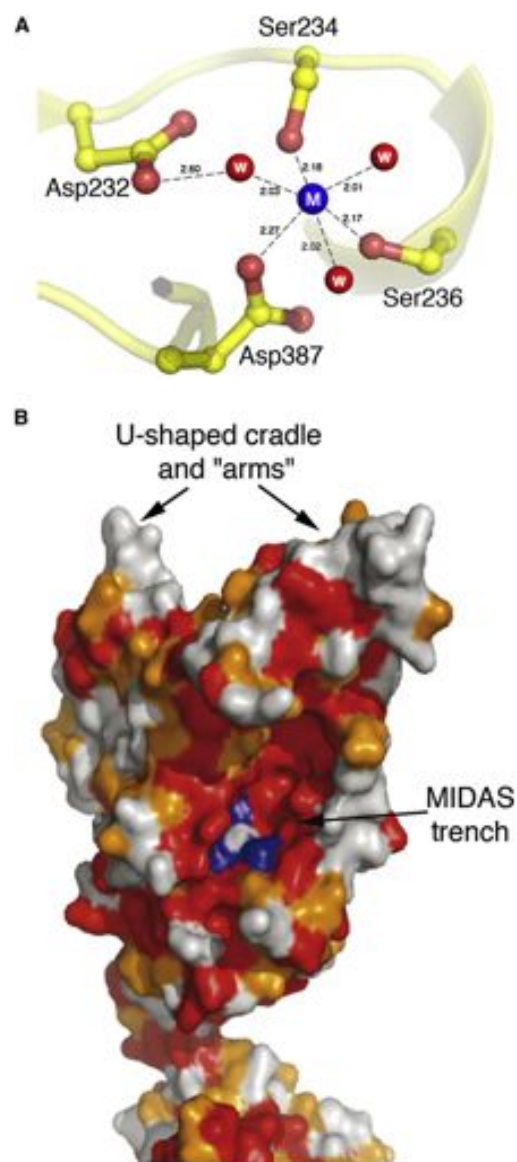


Figure 3. The MIDAS Motif of RrgA

(A) The metal ion, refined here as a Mg^{2+} , is stabilized by a classical constellation of residues also seen in MIDAS motifs of eukaryotic proteins. (B) Mapping of identical (red) and similar (orange) residues in RrgA-like adhesins in Streptococcal spp. (*S. pneumoniae*, *S. agalactiae*, *S. pyogenes*) onto the structure of the D3 domain of RrgA. Residues involved in forming the MIDAS motif are in dark blue. The central region of the domain, which harbors the MIDAS motif, is the most conserved, while the arms of the structure display patches of nonconserved sequence.

as GAGs that are directly associated to fibronectin and laminin) and thus bridge the interaction between the bacterium and the ECM. Interestingly, only few of the basic residues identified in the U-shaped cradle of RrgA are strictly conserved (as Lys or

Structure

Structure of the Pneumococcal Pilus Adhesion

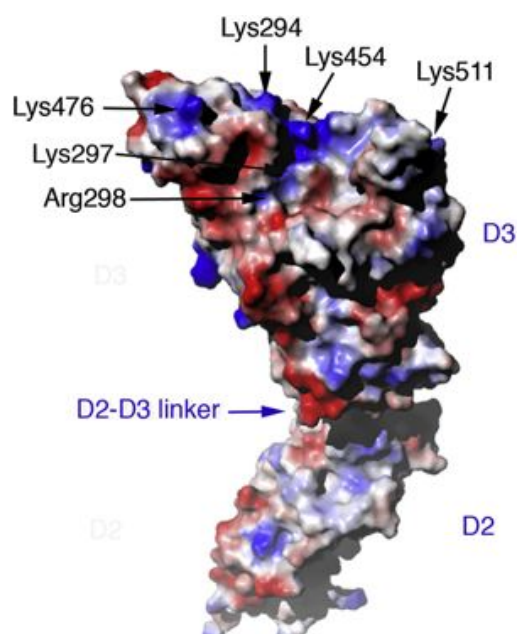


Figure 4. Another ECM-Binding Region Is Formed by the Inserted Arms

Surface potential diagram of the D3 domain of RrgA that shows the basic U-shaped cradle. This view is 180° away from the one shown in Figure 3B.

Arg) among the sequences of the pilus adhesins of *S. agalactiae* and *S. pyogenes* (Figures 2 and 3B), suggesting that the crevice formed by the arms in these adhesins could potentially recognize other host cell molecules. This observation could provide a partial explanation for the distinct tissue tropism observed for pilated Gram-positive species.

The “Stalk” Is Stabilized by Intramolecular Isopeptide Bonds

The pilus-forming biosynthetic machinery in Gram-positive organisms requires the formation of intermolecular isopeptide bonds, notably between the sortases and the LPXTG-like motif on their target proteins (Mandlik et al., 2008b; Scott and Zahner, 2006). In addition, isopeptide bonds formed within a single domain have also been identified in the structure of Sp0128, the major pilin subunit from *S. pyogenes* (Kang et al., 2007) and of a minor accessory pilus molecule from the *S. agalactiae* pilin (Krishnan et al., 2007). These bonds have been shown to be the product of an intramolecular reaction between the side chains of a Lys and an adjacent Asp residue, and the NZ and OD1 atoms of the resulting bond are both stabilized by hydrogen bonding with an acidic residue in the immediate vicinity (Kang et al., 2007). RrgA harbors two intramolecular isopeptide bonds, one located in the Cna-B-like D2 domain, and a second one in D4. The bond within D2 is formed between the side chain of Lys191 (in the N-terminal region of the RrgA sequence) and Asn695 (in the C terminus of the structure). Although an acidic group (Asp600) is located in its vicinity, the side chains of Thr694 and Thr698 also provide additional stabilization for the

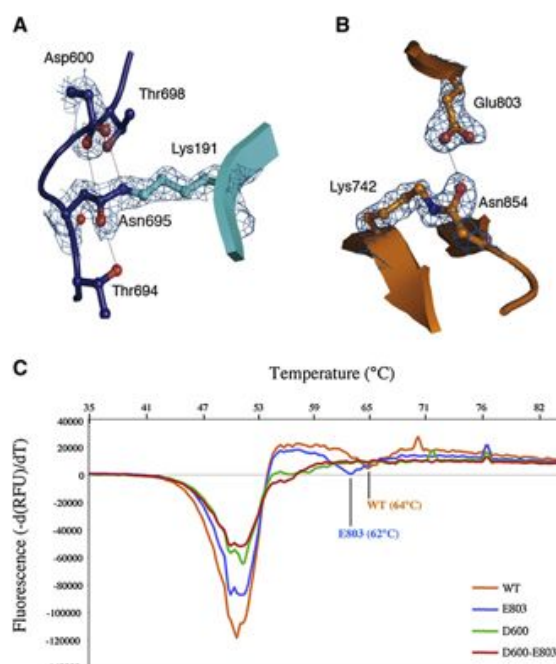


Figure 5. Domains D2 and D4 Are Stabilized by Intramolecular Isopeptide Bonds

(A) Domain D2 carries a bond between the side chains of Lys191 and Asn695 that, in addition to Asp600, is also stabilized by two Thr hydroxyl groups.

(B) The isopeptide bond in domain D4 is stabilized by nearby Glu803. In both (A) and (B), Fo-Fc simulated annealing omit maps are shown.

(C) Thermal shift analysis results for RrgA isopeptide bond mutants. Wild-type RrgA (orange) displays maxima at 51°C and 64°C, while mutants involving the D2 domain isopeptide bond have lost the 64°C peak, indicating that the RrgA stalk could be compromised.

isopeptide linkage (Figure 5A). The isopeptide bond present in D4 is formed by proximal elements of the C-terminal sequence, namely Lys742 and Asn854; the hydrogen bonding stabilization profile is more classical, being provided by Glu803 (Figure 5B). As is the case for other isopeptide linkages, the intramolecular isopeptide bonds in RrgA are also surrounded by hydrophobic residues: Ile206, Leu208, and Phe713 for the D2 bond and Leu751, Phe756, and Ile852 for the D4 bond.

We sought to confirm the importance of the two isopeptide bonds for RrgA's stability using site-specific mutagenesis, mass spectrometry, and thermal shift analyses. The molecular mass of wild-type RrgA, measured by mass spectrometry, was consistent with the absence of two NH₃ groups (thus confirming the formation of two isopeptide bonds; see Table 2). We initially studied the isopeptide bond in D2, and generated single mutants in which Lys191, Asn695, and Asp600 were mutated into alanines. For each mutant, the measured mass was compatible with the loss of one isopeptide bond; thus, mutants K191A and N695A were no longer capable of generating the isopeptide bond in D2 (uniquely in D4). Interestingly, an RrgA variant carrying a D600A mutation behaved similarly to the K191A and N695A mutants, also displaying the inability to generate one



Structure

Structure of the Pneumococcal Pilus Adhesion

Table 2. Mass Measurements of RrgA Variants by Electrospray Ionization Mass Spectrometry Time-of-Flight Mass

	CalculatedMass (Da)	MeasuredMass (Da)	Mass Difference (Calculated - Measured)	Number of Isopeptide Bonds Present
WT RrgA	94 197.5	94,163.7	33.8	2
E803A	94 139.5	94,123.8	15.7	1
K191A	94 140.4	94,124.8	15.6	1
N695A	94 154.5	94,139.3	15.2	1
D600A	94 153.5	94,139.3	14.2	1
D600A/E803A	94 095.5	94,096.0	À 0.5	0

The presence of one isopeptide bond corresponds to the loss of one NH₃ group (17Da).

isopeptide bond even in the presence of intact Lys191 and Asn695 side chains. These results suggest that the function of the acidic side chain in isopeptide bond formation is dual: it provides hydrogen bonding stabilization to the bond once it is formed, but must also play a key role in its formation during protein folding. In light of these results and in order to study the isopeptide bond located within domain D4, we generated an RrgA variant carrying a single E803A mutation. Mass spectrometric measurements of RrgA-E803A confirmed that one isopeptide bond was also missing in this form, thus confirming that the presence of an acidic residue in the immediate environment of an isopeptide bond is an essential factor for its formation. Notably, no isopeptide bonds could be identified in an RrgA-D600A-E803A double mutant (Table 2).

We then performed thermal shift analyses of all RrgA variants. Proteins were gradually heated in an IQ5 Bio-Rad apparatus and thermal unfolding curves were monitored through the detection of changes in fluorescence of a Sypro Orange probe. This analysis (Figure 5c) reveals that wild-type RrgA displays two unfolding maxima: the first at approximately 51 C (±0.5), which is shared with all other RrgA variants, and a second, less pronounced peak, whose T_m value is approximately 64 C (±0.2). Because the major peak is present in experiments with all RrgA forms independent of the presence or absence of isopeptide bonds, it could represent the unfolding of the D3 domain. In the RrgA-E803A variant, which lacks the isopeptide bond in domain D4, the T_m of the second peak is 2 C lower than for the wild-type form; this observation suggests that the minor peak corresponds to the unfolding of the smaller domains. Notably, in the cases of both RrgA-D600A and RrgA-D600A-E803A, the second peak is not observed; the absence of this second transition point suggests that absence of the isopeptide bond in domain D2 (Cna-B-like) engenders a destabilization of the entire RrgA stalk. Recently, it has been shown that the isopeptide bonds carried by *S. pyogenes* Sp0128 also play a key role in stabilization of the fiber-forming molecule (Kang and Baker, 2009) whereas isopeptide bonds in the analogous molecule of *B. cereus*, BcpA, are crucial for pilus assembly (Budzik et al., 2008). These results confirm that such bonds play a universal stabilizing role in the pilus-formation processes of Gram-positive species.

DISCUSSION

Adhesion to target host cells by surface-exposed virulence factors, such as pili, is a key step in infection establishment by

a large number of bacterial pathogens. The well-studied pili from Gram-negative pathogens have been shown to display specific adhesins on their tips that play important roles in adherence to both the extracellular matrix and to glycoprotein or glycolipid receptors, often determining tissue tropism (Proft and Baker, 2009; Soto and Hultgren, 1999). In Gram-positive pathogens, however, clarification of the details of the pilus-mediated adhesion process has only recently started. In this work, we report the structural characterization of a totally novel adhesin that is essential for the infectivity process of a major human pathogen and whose tertiary fold is composed of linearly aligned domains observed in both eukaryotic and prokaryotic organisms.

RrgA is composed of four independent domains linked by flexible regions. This organization can potentially allow for interdomain flexibility, which could be important for the recognition of different host targets during the infection process, while the presence of two isopeptide bonds guarantees stability of the individual domains. The composite nature of RrgA includes two IgG domains (D1/D4), and their potential function could include enhancement of binding of the adhesin to host tissue receptors and/or providing stability for the macromolecule. These functions are observed in a number of bacterial adhesins; PapG, for example, is located at the distal end of the P pilus of uropathogenic *E. coli* (UPEC) and folds into two IgG-like domains, one of which is key for receptor recognition (Dodson et al., 2001). The GB552 pilus adhesin of *S. agalactiae* also harbors two IgG-like regions, one of which is key in promoting adherence to lung tissue, while the second one provides structural support (Krishnan et al., 2007). In RrgA, the latter function could be shared by its Cna-B-like domain (D2), because the B domain of collagen-binding protein Cna of *S. aureus* has also been suggested as being the stalk that projects the A collagen-binding domain away from the bacterial surface and toward the ECM (Deivanayagam et al., 2000). In RrgA, domains D1, D2, and D4 are associated linearly, with D3 located at the edge (Figures 1; Figure S1). This arrangement suggests that one of the roles of domains D1, D2, and D4 could be to project the ECM-recognition D3 domain away from the pilus fiber in order to reach out toward the host cell as much as possible. Association of RrgA to the RrgB pilus backbone is catalyzed through recognition of dedicated sortases of the LPXTG-like CWSS motif on the C terminus of D4, lending support to this hypothesis.

The D3 domain of RrgA harbors two different potential ECM-recognition platforms: the integrin I domain, shown to participate in collagen binding in many eukaryotic proteins, and the basic



Structure

Structure of the Pneumococcal Pilus Adhesion

U-shaped cradle, located at the very edge of the adhesin, which could potentially be the binding site for negatively charged glucosaminoglycans or other acidic molecules of the ECM. The high sequence similarity between RrgA and pilus adhesins from *S. pyogenes* and *S. agalactiae* points to the possibility that the three-dimensional fold of these proteins could be highly similar (notably with the strict conservation of the MIDAS motif in all three molecules, Figures 2 and 3B); the identification of collagen-binding capabilities by a *S. pyogenes* strain (Kreikemeyer et al., 2005) provides support for this proposition. In addition, the presence of the integrin I domain, which is widespread in a number of eukaryotic proteins, in pilus-associated adhesins of all three pathogenic species suggests that this could be a strategy that allows the pathogen to evade host defense mechanisms. Albeit the structural similarity of the core regions, there are notable charge differences within the arms (notably within residues forming the cradle) that could be an indication of the differential interaction of such adhesins with the host, which is to be expected from molecules that target different tissues.

RrgA and its counterparts in *S. pyogenes* and *S. agalactiae* have been shown to provide protection in animal models of acute disease and could thus represent interesting potential antigens for vaccine development (Abbot et al., 2007; Nelson et al., 2007; Dramsi et al., 2006; Maisey et al., 2007). Notably, strategies for the generation of novel vaccines include the rational engineering of antigenic targets through the understanding of domain boundaries and epitope structures (Dornitzer et al., 2008). The identification of individual domains with distinct host cell recognition functions in the structure of the pilus adhesin reported here is an essential step in this process, and should be exploited in the development of novel anti-streptococcal vaccines. In addition, the predicted structural similarity between the adhesins of these three major pilated microorganisms suggests that the RrgA structure could provide a basis for the understanding of ECM-recognition features by different Gram-positive pathogens.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Expression and Purification of Recombinant Proteins

The region of the *S. pneumoniae* TIGR4 *rrgA* gene (SP0462) coding for amino acids 39 to 868 was amplified using conventional polymerase chain reaction (PCR) methodologies and cloned into vector pLIM (Protein Expert, Grenoble). The resulting vector was transformed into *E. coli* RIL cells (Invitrogen) to produce recombinant protein with an N-terminal hexahistidine tag. Protein expression was induced in Terrific Broth with 1 mM IPTG at 37 °C for 3 hr. Bacteria were collected by centrifugation, resuspended in a minimal volume of buffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl [pH 8.0], 20 mM Imidazole, 1 mM PMSF, 0.1 mM aprotinin, and 1 mM pepstatin) and lysed by sonication. The lysate was clarified by centrifugation and applied onto an immobilized metal chelate affinity chromatography column (HisTrapHP; GE Healthcare) pre-equilibrated in lysis buffer. Protein elution was performed by an imidazole step-gradient. Fractions containing RrgA were pooled and dialyzed 3 hr into 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl (pH 8.0) at 4 °C, and subsequently incubated with 1/5 (w:w) TEV protease at 15 °C. The protein was reloaded onto an HisTrapHP column and the eluted cleaved products dialyzed 3 hr into the same buffer as above. Subsequently, RrgA was loaded onto a MonoQ (5/50GL GE Healthcare) column in 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) and eluted in the flow through; fractions were pooled, concentrated, and injected onto a HiLoad 16/60 Superdex 200 (GE Healthcare) column in 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl (pH 8.0). Pooled and concentrated fractions were used for crystallization tests. All RrgA variants were expressed using the same methodology, except that the MonoQ step was not employed.

Selenomethionylated RrgA was expressed in *E. coli* RIL cells in minimal medium supplemented with thiamine (0.2 mg/ml), leucine (50 mg/ml), valine (50 mg/ml), isoleucine (50 mg/ml), lysine (100 mg/ml), phenylalanine (100 mg/ml), threonine (100 mg/ml), and selenomethionine (60 mg/ml). Expression and purification was performed as for the native protein.

The pLIM-RrgA expression plasmid served as a template for the introduction of single amino or double acid substitutions by PCR using the QuikChange XL Site Directed Mutagenesis Kit (Stratagene). All the mutant constructs were subsequently sequenced; the results showed that only expected mutations were introduced during PCR. Expression and purification of all RrgA mutants were performed as for the wild-type protein.

Crystallization, Data Collection, and Structure Solution

Crystals of native RrgA were grown by the hanging-drop vapor diffusion method at 20 °C in 20% PEG 3350, 0.2 M disodium phosphate dihydrate, while selenomethionine crystals were produced in 50 mM MES (pH 6.5), 5% PEG 4000, 10% glycerol, and 100 mM NaCl. Both native and selenomethionylated crystals were cryoprotected by successive brief incubations in mother liquor containing increasing concentrations of glycerol (up to 20%), and were subsequently flash-cooled in liquid nitrogen until data collection. A three-wavelength MAD experiment was performed on the Se edge on the ID-29 beamline (2.4 Å, space group P2₁). The three data sets from the MAD experiment were processed and scaled with XDS (Kabsch, 1993); identification of selenium atom positions, refinement, and phasing were performed with AutoSHARP (Bricogne et al., 2003; de la Fortelle and Bricogne, 1997) and automatic model building was performed with ARP/wARP 7.0.1 (Perrakis et al., 1999). PHASER (Storoni et al., 2004) was subsequently used to perform molecular replacement using the model generated by the MAD experiment in order to phase a native data set (1.9 Å, space group P2₁2₁2₁) collected at the European Synchrotron Radiation Facility (ESRF) ID23-EH1 beamline (Grenoble, France). Cycles of automatic and manual building were performed using ARP/wARP and Coot (Emsley and Cowtan, 2004), respectively, coupled with refinement cycles by REFMAC 5.4 (Murshudov et al., 1997).

Fluorescence-Based Assays

Assays were conducted in an IQ5 96-well format real-time PCR instrument (Bio-Rad) in the presence of a Sypro Orange (Molecular Probes) probe. The total volume was to 25 nL. Samples were heat-denatured from 20 °C to 100 °C at a rate of 1 °C per minute. At each step, excitation was performed at 470 nm, while emission of Sypro Orange fluorescence was monitored at 570 nm. Plotting of the fluorescence versus temperature curves, followed by the calculation of the first derivative at each point allowed the identification of each inflection point; the minima were referred to as the melting temperatures (T_m). Data result from two independent experiments performed in triplicate.

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information includes five figures and can be found with this article online at doi:10.1016/j.str.2009.10.019.

ACKNOWLEDGMENTS

The coordinates of RrgA have been deposited at the Protein Data Bank with code 2WW8 and are available prerelease from the authors. The authors wish to thank Richard Kahn (IBS) and the staff of ESRF beamlines ID29 and ID23 for help with data collection, Izabel Béard and Eric Forest from the IBS mass spectrometry facility (LSMP, IBS) for analyses, J. Marquez and the HTX Lab team (Partnership for Structural Biology) for access to and help with high-throughput crystallization, and Hugues Lortat-Jacob (IBS) for many helpful discussions. This work was partly supported by a Young Investigator (ANR Jeunes Chercheurs) grant to A.M.D.G. (n° 05-JCJ C-0049) and by EC grant LSHM-CT-2004-512138 (to A.D.).

Received: August 21, 2009

Revised: September 29, 2009

Accepted: October 22, 2009

Published: January 12, 2010



Structure

Structure of the Pneumococcal Pilus Adhesion

REFERENCES

- Abbot, E.L., Smith, W.D., Siou, G.P.S., Chiriboga, C., Smith, R.J., Wilson, J.A., Hirst, B.H., and Kehoe, M.A. (2007). Pili mediate specific adhesion of *Streptococcus pyogenes* to human tonsil and skin. *Cell. Microbiol.* 9, 1822–1833.
- Barocchi, M.A., Ries, J., Zogaj, X., Hemsley, C., Albiger, B., Kanth, A., Dahlberg, S., Fernebro, J., Moschioni, M., Massignani, V., et al. (2006). A pneumococcal pilus influences virulence and host inflammatory responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 2857–2862.
- Bienkowska, J., Cruz, M., Atilano, A., Handin, R., and Liddington, R. (1997). The von Willebrand Factor A3 domain does not contain a metal ion-dependent adhesion site motif. *J. Biol. Chem.* 272, 25162–25167.
- Bricogne, G., Vornrhein, C., Flensburg, C., Schiltz, M., and Paciorek, W. (2003). Generation, representation and flow of phase information in structure determination: recent developments in and around SHARP 2.0. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 59, 2023–2030.
- Bronzwaer, S.L., Cars, O., Buchholz, U., Molstad, S., Goettsch, W., Veldhuijzen, I.K., Kool, J.L., Sprenger, M.J.W., and Degener, J.E. (2002). A European study on the relationship between antimicrobial use and antimicrobial resistance. *Emerg. Infect. Dis.* 8, 278–282.
- Budzik, J.M., Marraffini, L.A., Souda, P., Whitelegge, J.P., Faull, K.F., and Schneewind, O. (2008). Amide bonds assemble pili on the surface of bacilli. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 10215–10220.
- Cruz, M.A., Yuan, H., Lee, J.R., Wise, R.J., and Handin, R.J. (1995). Interaction of the von Willebrand factor (vWF) with collagen. *J. Biol. Chem.* 270, 10822–10827.
- de la Fortelle, E., and Bricogne, G. (1997). Maximum-likelihood heavy-atom parameter refinement for multiple isomorphous replacement and multiwavelength anomalous diffraction methods. *Methods Enzymol.* 276, 472–494.
- Deivanayagam, C.C.S., Rich, R.L., Carson, M., Owens, R.T., Danthuluri, S., Bice, T.W., Hook, M., and Narayana, S.V.L. (2000). Novel fold and assembly of the repetitive B region of the *Staphylococcus aureus* collagen-binding surface protein. *Structure* 8, 67–78.
- Dodson, K.W., Pinkner, J.S., Rose, T., Magnusson, G., Hultgren, S.J., and Waksman, G. (2001). Structural basis of the interaction of the pyelonephritic E. coli adhesin to its human kidney receptor. *Cell* 105, 733–743.
- Dormitzer, P.R., Ulmer, J.B., and Rappuoli, R. (2008). Structure-based antigen design: a strategy for next generation vaccines. *Trends Biotechnol.* 26, 659–667.
- Dramsi, S., Caliot, E., Bonne, I., Guadagnini, S., Prevost, M.-C., Kojadinovic, M., Lalioui, L., Poyart, C., and Trieu-Cout, P. (2006). Assembly and role of pili in group B streptococci. *Mol. Microbiol.* 60, 1401–1413.
- Dramsi, S., Magnet, S., Davison, S., and Arthur, M. (2008). Covalent attachment of proteins to peptidoglycan. *FEMS Microbiol. Rev.* 32, 307–320.
- Emsley, P., and Cowtan, K. (2004). Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 60, 2126–2132.
- Emsley, J., Knight, C.G., Farnside, R.W., Barnes, M.J., and Liddington, R. (2000). Structural basis of collagen recognition by integrin $\alpha 2b1$. *Cell* 101, 47–56.
- Fälker, S., Nelson, A.L., Morfeldt, E., Jonas, K., Hultenby, K., Ries, J., Melefors, O., Normark, S., and Henriques-Normark, B. (2008). Sortase-mediated assembly and surface topology of adhesive pneumococcal pili. *Mol. Microbiol.* 70, 595–607.
- Gianfaldoni, C., Censini, S., Hillergermann, M., Moschioni, M., Facciotti, C., Pansegrau, W., Massignani, V., Covacci, A., Rappuoli, R., Barocchi, M.A., and Ruggiero, P. (2007). *Streptococcus pneumoniae* pilus subunits protect mice against lethal challenge. *Infect. Immun.* 75, 1059–1062.
- Hillergermann, M., Giusti, F., Baudner, B.C., Massignani, V., Covacci, A., Rappuoli, R., Barocchi, M.A., and Ferlenghi, I. (2008). Pneumococcal pili are composed of protofilaments exposing adhesive clusters of RrgA. *PLoS Pathog.* 4, e1000026.
- Huizinga, E.G., van der Plas, R.M., Kroon, J., Sixma, J.J., and Gros, P. (1997). Crystal structure of the A3 domain of human von Willebrand factor: implications for collagen binding. *Structure* 5, 1147–1156.
- Imberty, A., Lortat-Jacob, H., and Perez, S. (2007). Structural view of glycosaminoglycan-protein interactions. *Carbohydr. Res.* 342, 430–439.
- Kabsch, W. (1993). Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants. *J. Appl. Crystallogr.* 26, 795–800.
- Kamata, T., and Takada, Y. (1994). Direct binding of collagen to the I domain of integrin $\alpha 2b1$ (VLA-2, CD49b/CD29) in a divalent cation-independent manner. *J. Biol. Chem.* 269, 26006–26010.
- Kang, H.J., and Baker, E.N. (2009). Intramolecular isopeptide bonds give thermodynamic and proteolytic stability to the major pilin protein of *Streptococcus pyogenes*. *J. Biol. Chem.* 284, 20729–20737.
- Kang, H.J., Coulibaly, F., Clow, F., Proft, T., and Baker, E.N. (2007). Stabilizing isopeptide bonds revealed in Gram-positive bacterial pilus structure. *Science* 318, 1625–1628.
- Kreikemeyer, B., Nakata, M., Oehmcke, S., Gschwendtner, C., Normann, J., and Podbielski, A. (2005). *Streptococcus pyogenes* collagen type I-binding Cpa surface protein. Expression profile, binding characteristics, biological function, and potential clinical impact. *J. Biol. Chem.* 280, 33228–33239.
- Krishnan, V., Gaspar, A.H., Ye, N., Mandlik, A., Ton-That, H., and Narayana, S.V.L. (2007). An IgG-like domain in the minor pilin GBS52 of *Streptococcus agalactiae* mediates lung epithelial cell adhesion. *Structure* 15, 893–903.
- Lee, J.-O., Bankston, L.A., Amaout, M.A., and Liddington, R.C. (1995a). Two conformations of the integrin A-domain (I-domain): a pathway for activation? *Structure* 3, 1333–1340.
- Lee, J.-O., Rieu, P., Amaout, M.A., and Liddington, R. (1995b). Crystal structure of the A domain from the α subunit of integrin CR3 (CD11b/CD18). *Cell* 80, 631–638.
- LeMieux, J., Hava, D.L., Basset, A., and Camilli, A. (2006). RrgA and RrgB are components of a multisubunit pilus encoded by the *Streptococcus pneumoniae* rlrA pathogenicity islet. *Infect. Immun.* 74, 2453–2456.
- Levine, O.S., O'Brien, K.L., Knoll, M., Adegbola, R.A., Black, S., Cherian, T., Dagan, R., Goldblatt, D., Grange, A., Greenwood, B.M., et al. (2006). Pneumococcal vaccination in developing countries. *Lancet* 367, 1880–1882.
- Maione, D., Margarit, I., Rinaudo, C.D., Massignani, V., Mora, M., Scarselli, M., Tettelin, H., Brettoni, C., Iacobini, E.T., Rosini, R., et al. (2005). Identification of a universal group B *Streptococcus* vaccine by multiple genome screen. *Science* 309, 148–150.
- Maisey, H.C., Hensler, M., Nizet, V., and Doran, K.S. (2007). Group B streptococcal pilus proteins contribute to adherence to and invasion of brain microvascular endothelial cells. *J. Bacteriol.* 189, 1464–1467.
- Mandlik, A., Swierczynski, A., Das, A., and Ton-That, H. (2007). Corynebacterium diphtheriae employs specific minor pilins to target human pharyngeal epithelial cells. *Mol. Microbiol.* 64, 111–124.
- Mandlik, A., Das, A., and Ton-That, H. (2008a). The molecular switch that activates the cell wall anchoring step of pilus assembly in gram-positive bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 14147–14152.
- Mandlik, A., Swierczynski, A., Das, A., and Ton-That, H. (2008b). Pili in Gram-positive bacteria: assembly, involvement in colonization and biofilm development. *Trends Microbiol.* 16, 33–40.
- Manzano, C., Contreras-Martel, C., El Mortaji, L., Izore, T., Fenel, D., Vemet, T., Schoehn, G., Di Guilmi, A.M., and Dessen, A. (2008). Sortase-mediated pilus fiber biogenesis in *Streptococcus pneumoniae*. *Structure* 16, 1838–1848.
- Manzano, C., Izore, T., Di Guilmi, A.M., and Dessen, A. (2009). Sortase activity is controlled by a flexible lid in the pilus biogenesis mechanism of Gram-positive pathogens. *Biochemistry* 48, 10549–10557.
- Mora, M., Bensi, G., Capo, S., Falugi, F., Zingaretti, C., Manetti, A.G.O., Maggi, T., Taddei, A.R., Grandi, G., and Telford, J.L. (2005). Group A *Streptococcus* produce pilus-like structures containing protective antigens and Lancefield T antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 15641–15646.
- Murshudov, G., Vagin, A., and Dodson, E. (1997). Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 53, 240–255.



Structure

Structure of the Pneumococcal Pilus Adhesion

- Nallapareddy, S.R., Singh, K.V., Sillanpaa, J., Garsin, D.A., Hook, M., Erlandsen, S.L., and Murray, B.E. (2006). Endocarditis and biofilm-associated pili of *Enterococcus faecalis*. *J. Clin. Invest.* 116, 2799–2807.
- Neiers, F., Madhurantakam, C., Fäiker, S., Manzano, C., Dessen, A., Normark, S., Henriques-Normark, B., and Achour, A. (2009). Two crystal structures of pneumococcal pilus sortase C provide novel insights into catalysis and substrate specificity. *J. Mol. Biol.* 393, 704–716.
- Nelson, A.L., Ries, J., Bagnoli, F., Dahlberg, S., Falkner, S., Rounioja, S., Tschop, J., Morfeldt, E., Ferlenghi, I., Hilleringmann, M., et al. (2007). RrgA is a pilus-associated adhesin in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* 66, 329–340.
- Perrakis, A., Morris, R.M., and Lamzin, V.S. (1999). Automated protein model building combined with iterative structure refinement. *Nat. Struct. Biol.* 6, 458–463.
- Proft, T., and Baker, E.N. (2009). Pili in Gram-negative and Gram-positive bacteria—structure, assembly, and their role in disease. *Cell. Mol. Life Sci.* 66, 613–635.
- Qu, A., and Leahy, D.J. (1995). Crystal structure of the I-domain from the CD11a/CD18 (LFA-1, αLβ2) integrin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 10277–10281.
- Scott, J.R., and Zahner, D. (2006). Pili with strong attachments: Gram-positive bacteria do it differently. *Mol. Microbiol.* 62, 320–330.
- Soto, G.E., and Hultgren, S.J. (1999). Bacterial adhesins: common themes and variations in architecture and assembly. *J. Bacteriol.* 181, 1059–1071.
- Springer, T.A. (2006). Complement and multifaceted functions of VWA and integrin I domains. *Structure* 14, 1611–1616.
- Storoni, L.C., McCoy, A.J., and Read, R.J. (2004). Likelihood-enhanced fast rotation functions. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 60, 432–438.
- Telford, J.L., Barocchi, M.A., Margarit, I., Rappuoli, R., and Grandi, G. (2006). Pili in Gram-positive pathogens. *Nat. Rev. Microbiol.* 4, 509–519.
- Ton-That, H., and Schneewind, O. (2004). Assembly of pili in Gram-positive bacteria. *Trends Microbiol.* 12, 228–234.
- Tuckwell, D., Calderwood, D.A., Green, L.J., and Humphries, M.J. (1995). Integrin α2 I-domain is a binding site for collagens. *J. Cell Sci.* 108, 1629–1637.
- Vorup-Jensen, T., Ostermeier, C., Shimaoka, M., Hommel, U., and Springer, T. (2003). Structure and allosteric regulation of the αxβ2 integrin I domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 1873–1878.

Note Added in Proof

As this manuscript was going to press, Hilleringman and coworkers published work describing the electron microscopy analysis of streptococcal pili, where RrgA is clearly located at the tip of the pilus fibril (Hilleringman et al. (2009) *EMBO J.* 28, 3921–3930.).

II Discussion

Les études récentes concernant les pili des bactéries à Gram-positif, notamment dans notre institut, ont permis de mieux comprendre leur biogenèse ainsi que leur rôle dans les premières étapes de la colonisation par le pathogène.

Concernant RrgA, nous avons montré que cette protéine a évolué à partir de domaines eucaryotes et procaryotes pour être extrêmement adaptée à sa fonction. En effet, le domaine intégrine est porté par un piédestal lui permettant d'agir comme une main au bout d'un bras, ce qui augmente significativement la probabilité de rencontre avec son substrat. De plus, étant l'adhésine du pilus, RrgA est une des premières protéines à entrer en contact avec les mécanismes de défense de l'hôte et se doit donc d'être très stable. Cette stabilité est assurée par la présence de deux ponts isopeptidiques entre les chaînes latérales de lysines et d'asparagines dans les domaines D2 et D4, stabilisant ainsi l'ensemble de la structure. De plus, le domaine D1 est stabilisé par complémentation de brin bêta, un mécanisme qui fait écho au mécanisme de polymérisation des pili chez les bactéries à Gram-négatif.

L'étude de cette protéine en complexe avec une molécule, ou partie d'une molécule, composant la Matrice Extra Cellulaire, permettrait de mieux comprendre la présence des deux insertions au sein du domaine intégrine pourtant normalement très conservé.

Bien qu'au niveau structural l'étude des protéines isolées ait apporté de nombreux renseignements sur les fonctions de transpeptidation des sortases et d'adhésion de RrgA, la résolution d'un complexe acyl-enzyme entre une sortase et une protéine Rrg permettrait d'obtenir une vue plus précise de la spécificité du système. En effet, la structure d'un tel complexe poserait les bases de la reconnaissance sortase-substrat et permettrait de valider l'hypothèse postulant que la liaison de la protéine substrat aux sortases induise un changement conformationnel au niveau du « lid » des sortases et libérerait le site actif.

SECONDE PARTIE :

Le Système de Sécrétion de Type III (T3SS) chez Pseudomonas aeruginosa

INTRODUCTION

I *Pseudomonas aeruginosa*

I.1 Présentation générale

P. aeruginosa, ou bacille pyocyanique est une bactérie à Gram-négatif, se présentant sous forme de bacilles fins, droits et très mobiles grâce à une ciliature polaire monotriche (1 flagelle).



Figure 25:
Image de microscopie
électronique à balayage de *P.*
aeruginosa.
(www.sciencephoto.com)

Les bacilles ont une taille variant de 0,5 à 0,8 μm de diamètre pour une longueur de 1,5 à 3 μm et sont souvent organisés deux par deux ou en courtes chaînette. Ubiquitaire, *P. aeruginosa* peut se retrouver dans l'eau, les sols humides, les végétaux ou encore sous forme saprophyte dans le tube digestif humain. Grâce à une grande faculté d'adaptation et supportant des températures allant de 4°C à 43°C, la bactérie peut se développer aussi bien en milieu aérobie que anaérobie (Hoiby 2006).

Le génome de la souche de référence PAO1 a été séquencé en premier en 2000 (Stover *et al.*, 2000) ouvrant la voie au séquençage de différentes souches. Il a été montré que les génomes sont très conservés et notamment au niveau des gènes codant pour les facteurs de virulence (Wolfgang *et al.*, 2003).

Comme de nombreuses bactéries, *P. aeruginosa* est capable de former des biofilms, véritables colonies qui lui permettent de survivre en milieu hostile.

I.2 Infections à *P. aeruginosa*

P. aeruginosa est une bactérie capable d'infecter un nombre très important d'hôtes tels que les insectes, les plantes et bien sûr l'être humain. Pathogène opportuniste, le risque d'être infecté par cette bactérie pour une personne en bonne santé est très faible. En effet, *P. aeruginosa* n'est que peu présent et peu virulent lorsque le système immunitaire de l'hôte est fonctionnel. En effet, dans la majorité des cas, toute infection par cette bactérie est concomitante avec un affaiblissement du système immunitaire de l'hôte. Cela implique notamment les patients porteurs du VIH et les patients sous chimiothérapie. Les trois pathologies les plus récurrentes dues à *P. aeruginosa* sont les bactériémies des grands brûlés, l'infection chronique des voies respiratoires des patients atteints de mucoviscidose et l'atteinte de la cornée pour les porteurs de lentilles de contact (Lyczak *et al.*, 2000). La capacité de cette bactérie à se développer dans de très nombreuses conditions fait d'elle un des trois principaux organismes responsables d'infections nosocomiales (11%) après *E. coli* et *S. aureus* (INVS, 2006).

I.2.1 La mucoviscidose

La mucoviscidose est une maladie génétique autosomique récessive qui affecte un nouveau-né sur 2000 au sein des populations caucasiennes. Il existe en Europe près de 35000 enfants et jeunes adultes vivant avec cette maladie. Le gène responsable de cette anomalie génétique a été découvert en 1989 sur le chromosome 7 (Kerem *et al.*, 1989). Ce gène code pour un canal ionique responsable du transport du chlore appelé CFTR pour « Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator ». De nos jours plus de 1500 mutations de ce gène sont connues, menant au dysfonctionnement du canal CFTR ; la plus courante étant la délétion de la phénylalanine 508 ($\Delta F508$). Ce dysfonctionnement induit la diminution du volume du liquide para-ciliaire et par conséquent la diminution de l'efficacité de la clairance mucociliaire associée (Boucher, 2004) permettant ainsi le développement de bactéries. Dès lors, la présence de ces bactéries dans le mucus induit une forte réponse inflammatoire médiée par les leucocytes polynucléaires qui dégradent lentement les tissus pulmonaires.

Dès les premières années de vie, les patients atteints de mucoviscidose doivent donc faire face à la colonisation par de nombreux pathogènes opportunistes (*P. aeruginosa*, mais aussi *S. aureus*, *H. influenzae*... Vrankrijker *et al.*, 2010) et malgré les thérapies antibiotiques intensives qu'ils subissent, n'ont à terme d'autres issues que la transplantation pulmonaire ou

la mort. Près de 80% des adultes atteints de mucoviscidose présentent une infection chronique à *P. aeruginosa*. Cette bactérie possède une grande capacité d'adaptation qui lui permet de survivre et de se développer facilement dans différents environnements en conditions aérobies ou anaérobies et est notamment capable de croître sous forme de biofilms, se protégeant ainsi des antibiotiques et des défenses immunitaires de l'hôte (Hoiby 2006).

I.2.2 Formation de biofilms

La formation du biofilm se fait généralement sur une surface naturelle comme les dents, donnant lieu à la « plaque dentaire », sur le cœur, causant des endocardites, ou sur les poumons par exemple. Dans un biofilm, la colonie bactérienne, qui peut être composée d'une ou de plusieurs espèces, sécrète une matrice de biopolymères caractéristique contenant principalement des polysaccharides, des protéines et de l'ADN. Cette matrice stabilise le biofilm et protège les bactéries des attaques du système immunitaire de l'hôte et des antibiotiques. En effet, il est maintenant accepté que sous forme de biofilm, les bactéries sont de cent à mille fois plus résistantes que sous formes planctoniques (libre de leurs mouvements) (Hoiby *et al.*, 2011, b). *Pseudomonas aeruginosa* peut former un biofilm mature en seulement 5 à 7 jours. Pour cela, une bactérie planctonique va s'attacher de manière réversible à une surface. L'étape suivante est la multiplication cellulaire, l'adhésion permanente des bactéries au support et le début de la synthèse de la matrice. Cette étape est initiée par le Quorum-Sensing. Enfin, dans certains cas, des cellules peuvent recouvrir leurs attributs planctoniques, et ainsi quitter le biofilm et aller coloniser une nouvelle surface (Hoiby *et al.*, 2011, a).

I.3 Traitements des infections à *P. aeruginosa*

Le traitement des infections à *P. aeruginosa* est, au même titre que celui du pneumocoque, très difficile. Il n'existe encore aucun vaccin sur le marché pour lutter contre cette bactérie mais le groupe Intercell© en collaboration avec Novartis© élabore un vaccin, appelé IC43. Basé sur des antigènes dérivés de deux protéines de la membrane externe de la bactérie, les tests ont montré une réelle efficacité chez les patients atteints de brûlure du 2nd et 3^{ème} degré (www.intercell.com).

La thérapie actuelle est principalement basée sur les antibiotiques. De nombreuses familles d'antibiotiques sont utilisées (Pénicillines, Monobactames, Carbapénèmes, Aminosides, Fluoroquinolones). Cependant, concernant les patients atteints de mucoviscidose, la destruction du germe n'est jamais totale et l'infection, sous forme de biofilm notamment, perdure et ce même malgré les traitements anti-inflammatoires comme les macrolides qui, administrés dès les stades précoces de l'infection, ont montré une grande efficacité (Dinwiddie, 2005). D'autres part, les biofilms, responsables d'infections chroniques, sont maintenant des cibles privilégiées pour le développement de molécules inhibitrices. Il a été prouvé que des anions et des DNases pouvait induire la destruction des biofilms (Tolker-Nielsen *et al.*, 2009).

I.3.1 Résistance aux antibiotiques

P. aeruginosa possède de nombreux mécanismes de résistance naturels et acquis, le rendant multi-résistant à de très nombreuses classes d'antibiotiques. Les principaux mécanismes de résistance naturels sont portés par une bêta-lactamase de classe C (ampC, céphalosporinase), une imperméabilité naturelle à de nombreuses molécules et des pompes à efflux (comme MexAB-OprM) (Figure 26) (Tomas *et al.*, 2010 ; Friedland *et al.*, 2004). Les

résistances acquises par le biais de plasmides sont principalement impliquées dans la résistance aux bêta-lactames et aux aminoglycosides .

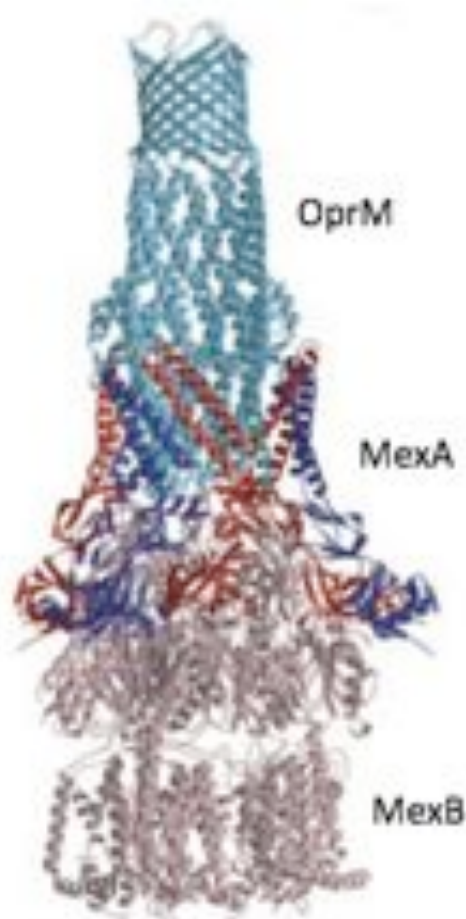


Figure 26:
Structure du complexe
d'efflux OprM-Mex-AB.

OprM est représenté en bleu clair, les dimères de MexA sont en bleu et rouge, MexB est en rose pâle.

II Le Système de Sécrétion de Type III (T3SS)

Le système de sécrétion de type III est probablement un des facteurs de virulence les plus importants chez *P. aeruginosa*. Cette bactérie possède cependant un arsenal de facteurs de virulence très complet composé notamment d'un lipopolysaccharide jouant un rôle important dans la réaction inflammatoire, d'un flagelle pour la motilité et l'initiation de la formation de biofilms, de pili de type IV... (Kipnis *et al.*, 2006) mais aussi de six systèmes de sécrétion différents (Type I, Type II, Type III, Type V a et b, type VI) impliqués dans la sécrétion de nombreuses toxines (Bleves *et al.*, 2010). Dans ce manuscrit, seul le Système de Sécrétion de Type III sera détaillé.

II.1 Généralités



Figure 27: Cliché de microscopie électronique du T3SS de *Salmonella* (Schraidt *et al.*, 2010).

Le système de sécrétion de type III ou injectisome est un complexe protéique présent chez plus d'une trentaine de bactéries à Gram-négatif. Sa structure en forme d'aiguille permet à la bactérie qui l'exprime d'interagir de manière intime avec une cellule-cible dans le cadre d'une symbiose aussi bien que dans le cadre d'une infection (Galan et Collmer, 1999). Il est notamment retrouvé chez les pathogènes humains tels que *Bordetella pertussis* (agent responsable de la coqueluche), *Chlamydia spp* (trachome, chlamydirose), *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica* (gastroentérites, septicémies), *Shigella flexneri* (dysenteries), *Yersinia spp* (peste ...) mais aussi chez des pathogènes de plantes ou d'animaux comme

Erwinia amylovora, *Mesorhizobium loti*, *Pseudomonas syringiae*, *Aeromonas salmonicida* Dans le cas des bactéries pathogènes, les toxines transloquées sont directement sécrétées dans le cytoplasme de la cellule hôte provoquant des effets très variables selon les organismes tels que la répression du système immunitaire de l'hôte, le remodelage du cytosquelette d'actine, l'inhibition de la phagocytose, l'initiation de l'apoptose (Cornelis, 2006 ; Cornelis et Van Gijsegem, 2000).

II.2 Différentes familles de systèmes de sécrétion de type III

De nombreuses espèces de bactéries à Gram-négatif possèdent un ou plusieurs systèmes de sécrétion de type III comme c'est le cas pour *Salmonella enterica*. En fonction de la proximité génétique de chaque système, sept familles d'injectisomes ont été définies (Cornelis, 2006).

De celle contenant le plus de représentants à celle en contenant le moins :

- 1) La famille Ysc : *Yersinia* spp., *P. aeruginosa*, *Aeromonas salmonicida*, *Bordetella pertussis* ...
- 2) La famille SPI-II (Salmonella Pathogenicity Island II) : *Salmonella enterica*, *E.coli*, *Citrobacter rodentium* ...
- 3) La famille SPI-I (Salmonella Pathogenicity Island I) : *Salmonella enterica*, *Shigella flexneri*, *Burkholderia pseudomallei* ...
- 4) La famille Hrp1 et 2 : *Pseudomonas synrigae*, *Erwinia amylovora* ...
- 5) La famille Hrp2 : *Burkholderia pseudomallei*, *Xanthomonas campestris* ...
- 6) La famille des *Rhizobium* : *Mezorhizobium loti*, *Rhizobium* spp.
- 7) La famille des *Chlamydiales* : *Chlamydia trachomatis* et *pneumoniae*.

Au sein de ces sept familles, de nombreuses protéines sont conservées, notamment les protéines formant la base du système et une forte similarité de séquence peut être observée.

Cette similarité de séquence, chez des bactéries très éloignées génétiquement, laisse penser que les sept familles de système de sécrétion de type III proviennent toutes de l'évolution d'un ancêtre commun apparenté au flagelle. La figure suivante illustre les similarités structurales entre le flagelle et le système de sécrétion de type III (Figure 28) :

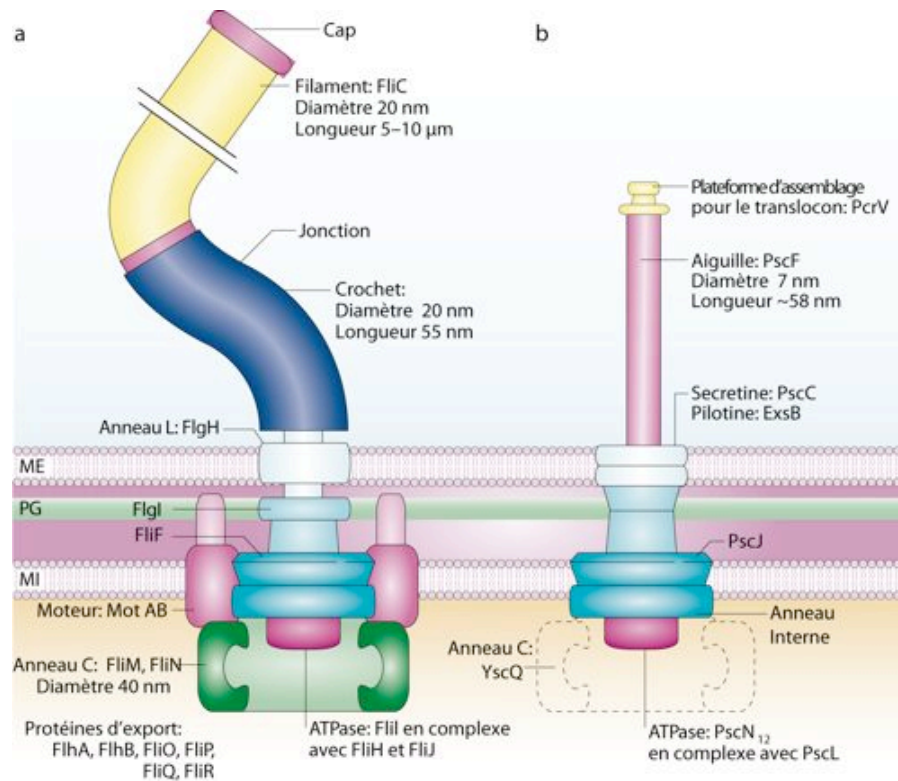


Figure 28:
Comparaison structurale schématique du flagelle (a) et du T3SS (b).

La base des deux appareils est conservée avec une structure commune au niveau de l'ATPase et d'un anneau cytoplasmique appelé l'anneau C. Les structures externes (crochet et filament pour le flagelle ainsi que l'aiguille pour le T3SS) ne sont pas conservées.

ME : Membrane externe
MI : Membrane interne
PG : Peptidoglycane

(Cornelis, 2006)

Cette similarité est très importante, notamment au niveau de l'ATPase du système et de ces nombreux partenaires (voir section sur l'ATPase).

L'organisation génétique du T3SS repose sur une organisation en opéron d'une trentaine de gènes variables suivant les organismes. Les gènes sont soit portés par le chromosome bactérien sous forme d'îlot de pathogénicité, comme chez *P. aeruginosa*, soit organisé autour d'un plasmide comme c'est le cas notamment pour le T3SS des *Yersinia* qui possèdent le plasmide pYV (plasmid *Yersinia* Virulence) (Cornelis *et al.*, 1998). Chez *P. aeruginosa*, le T3SS est composé de 36 gènes pouvant être classés en 5 catégories : les toxines, leur chaperonnes, les protéines impliquées dans la formation du pore de translocation, les protéines régulatrices et les protéines impliquées dans la structure et le fonctionnement du système (Figure 29 ; d'après Hauser 2009).

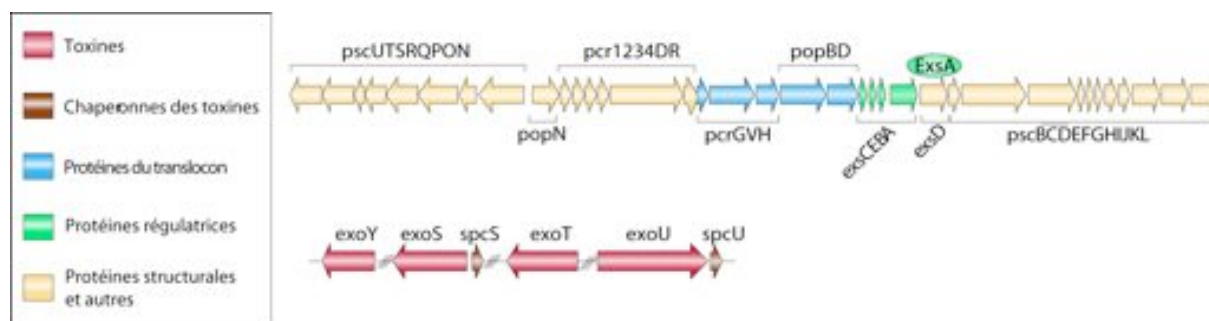


Figure 29:
Représentation graphique des gènes du système de sécrétion de type III chez *P. aeruginosa*.
(Hauser, 2009)

Le système de sécrétion de type III n'est pas exprimé de façon constitutive au sein des bactéries. Le prochain paragraphe présentera la régulation de l'expression de ce système.

II.3 Régulation transcriptionnelle du T3SS

L'expression du système de sécrétion de type III chez *P. aeruginosa* est en grande partie dépendante des conditions environnementales. Les deux facteurs principaux déclenchant l'expression des gènes codants pour le T3SS sont le contact avec une cellule-cible (Vallis *et al.*, 1999) et une concentration basse en Ca^{2+} dans le milieu environnant (Frank, 1997). L'expression conditionnelle du T3SS par la bactérie lui permet d'une part de réduire les dépenses énergétiques associées à la production de protéines lorsque cela n'est pas nécessaire, et d'autre part de réduire le nombre d'antigènes exposés à sa surface et ainsi limiter la stimulation du système immunitaire de l'hôte (Yahr et Wolfgang, 2006). Dans ce paragraphe, le contrôle de l'expression par le régulateur transcriptionnel « ExsA » sera détaillé.

ExsA, membre de la famille des régulateurs transcriptionnels AraC/XylS est essentiel à l'expression des gènes codants pour le T3SS (Dacheux *et al.*, 2001), se liant au promoteur de chaque opéron et permettant le recrutement de l'ARN polymérase. La régulation par ExsA fait intervenir trois autres protéines : ExsC, ExsD et ExsE (Figure 30). Seule la protéine ExsB, lipoprotéine de la membrane externe (Izoré *et al.*, 2011) codée par le même opéron, semble ne pas prendre part à la régulation du système.

A

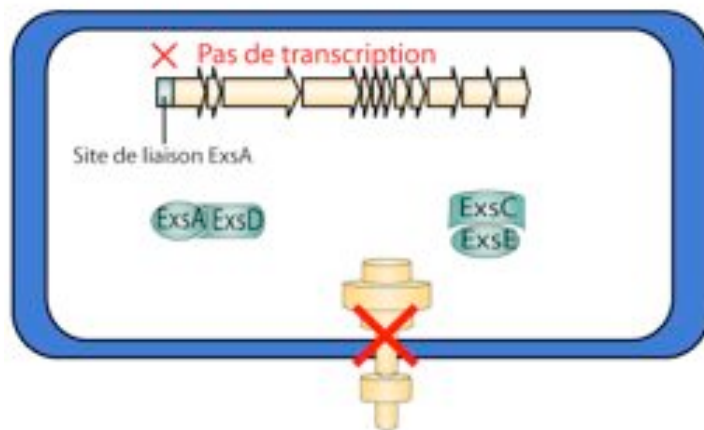
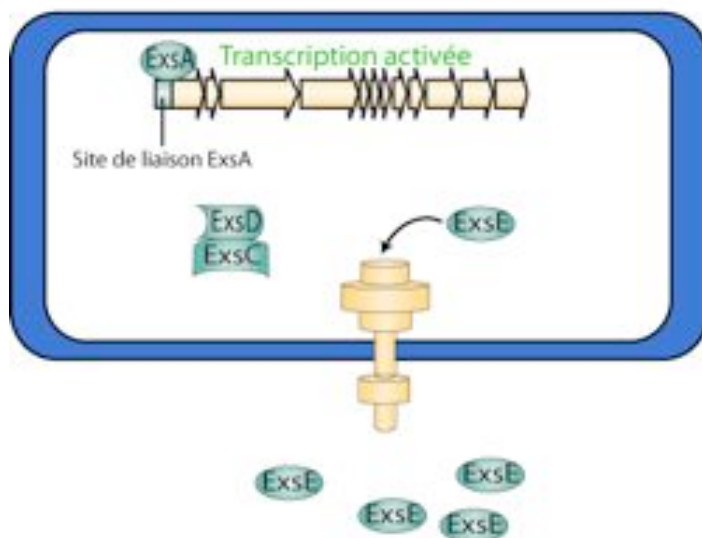


Figure 30: Régulation transcriptionnelle des gènes du T3SS par ExsA chez *P. aeruginosa*.

A. En absence du signal de sécrétion, ExsA est piégée en complexe avec l'anti-activateur ExsD et donc la transcription n'est pas activée.

B



B. En présence du signal de sécrétion, ExsA est libre et se lie au promoteur pour induire la synthèse des gènes.

(Adapté de Hauser, 2009)

Comme on peut le voir figure 30, la régulation de la transcription est intimement liée à la sécrétion. En effet, dans des conditions environnementales où la sécrétion n'est pas active (haute concentration en Ca^{2+} par exemple), ExsA est séquestrée par l'anti-activateur ExsD (McCaw *et al.*, 2002) et inhibe son activité (Thibault *et al.*, 2009). En présence du signal de sécrétion (contact avec un cellule cible, par exemple), la sécrétion est activée, ExsE est dissociée de ExsC puis sécrétée (Urbanowski *et al.*, 2005). ExsC est un anti-anti-activateur et peut dissocier le complexe ExsA-ExsD en déplaçant ExsA et ainsi former un nouveau complexe avec ExsD (Dasgupta *et al.*, 2004), protéine pour laquelle il possède une plus grande affinité (Vogelaar *et al.*, 2010). Cette action conduit à l'isolement de ExsA qui peut donc aller se positionner sur son promoteur spécifique et induire la transcription des gènes du T3SS.

De manière intéressante, la structure du complexe ExsE-ExsC (Vogellar *et al.*, 2010) révèle que ExsC, protéine régulatrice, possède le repliement caractéristique des chaperonnes de

toxines, (Figure 31) (Izoré *et al.*, 2011) bien que pour l'instant, aucun effet biologique sur les cellules eucaryotes n'ai été démontré après sécrétion de cette protéine.

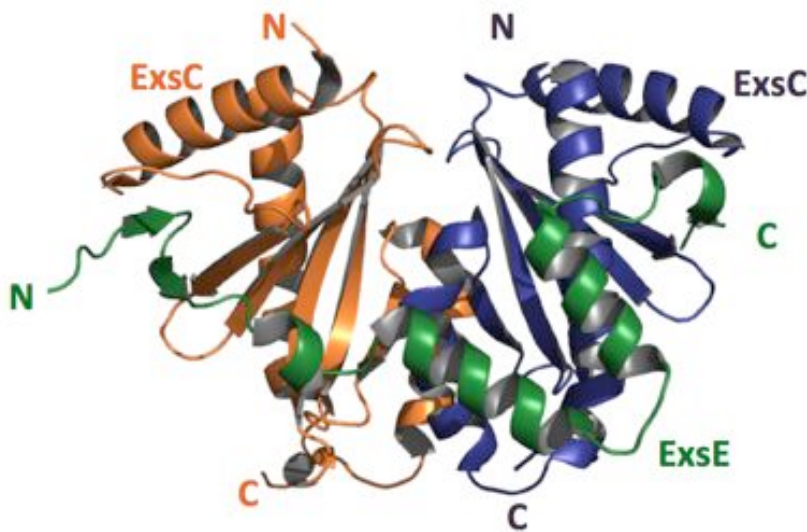


Figure 31: Structure du complexe ExsC-ExsE (2 : 1)

ExsC forme un dimère en forme de cœur, caractéristique des chaperonnes de toxines (orange et bleue)

ExsE (vert) s'enroule autour du dimère de chaperonne.

(D'après Vogellar *et al.*, 2010)

Il est important de noter que la transduction du signal de sécrétion et par conséquent l'expression massive du système, n'est toujours pas identifiée dans le cas du contact avec la cellule-hôte (Yahr et Wolfgang, 2006). Cependant, un modèle intéressant propose que l'aiguille elle-même serve à transmettre le signal, du pore jusqu'au cytoplasme bactérien au moment du contact avec la cellule-cible (Blocker *et al.*, 2008). Ce modèle est appuyé par la récente découverte que les protéines de l'aiguille chez *Shigella flexneri* et *Salmonella typhimurium* subissent des changements structuraux importants au moment de leur polymérisation (Poyraz *et al.*, 2010), attestant de leur flexibilité conformationnelle.

II.4 Description du système de sécrétion de type III

Le système de sécrétion est ce qu'on appelle une nano machine biologique, constituée de plus de 25 protéines dont la plupart sont conservées chez tous les systèmes connus. D'abord caractérisé chez *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* en 1998 (Kubori *et al.*, 1998), il est maintenant décrit pour plus de 30 espèces (Cornelis, 2006). Il se compose principalement de deux unités, le sécréton et le translocon :

Le sécréton est la première partie du système à se mettre en place. Il est composé de structures concentriques qui forment un canal à travers les deux membranes de la bactérie. Ces anneaux membranaires composent « la base ». L'ordre dans lequel la base est formée semble être dépendant de l'espèce bactérienne considérée. En effet, la biogénèse du T3SS de

la majorité des espèces débute par l'assemblage des anneaux de la membrane interne (Kimbrough et Miller, 2002), mais récemment, le groupe de Guy Cornelis a montré que *Yersinia enterocolitica* assemble la base de son système en commençant par YscC, la sécrétine localisée dans la membrane externe (Diepold *et al.*, 2010).

A cette base s'ajoute l'aiguille de sécrétion pour ainsi former « le sécréton ».

L'aiguille de sécrétion est polymérisée lorsque la base est préalablement fonctionnelle (étape 1, Figure 32). Lorsque l'aiguille a atteint la taille nécessaire, les translocateurs qui vont s'enchâsser dans la membrane de la cellule hôte sont sécrétés à leur tour (étape 2). Enfin, quand le pore de translocation est en place, le système transloque les toxines directement dans le cytoplasme de la cellule hôte (étape 3). La hiérarchisation de la sécrétion des composants formant le T3SS est finement régulée. Ceci sera discuté dans un prochain paragraphe. De plus, ces étapes ont été décrites d'un point de vue structural dans une revue parue dans le journal « Structure » (Izoré *et al.*, 2011).

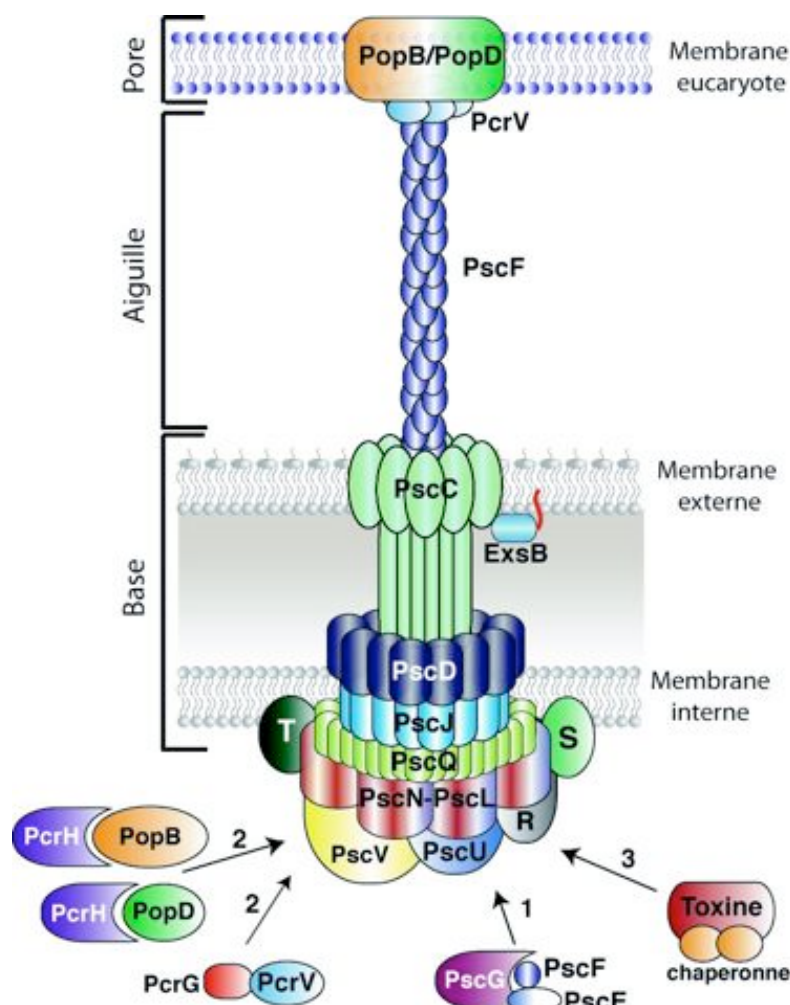


Figure 32: Schéma du Système de Sécrétion de Type III de *P. aeruginosa*.

Une fois la base assemblée, la protéine PscF est sécrétée et oligomérisée pour former l'aiguille (bleue). Dans un deuxième temps, les translocateurs PcrV, PopD et PopB sont sécrétés à leur tour et assemblés au sommet de l'aiguille, formant un pore. Enfin, les chaperonnes sont sécrétées directement dans le cytoplasme de la cellule hôte (Izoré *et al.*, 2011).

II.4.1 La base du système

« La base » est composée de 3 anneaux concentriques permettant de former un canal traversant la membrane interne, le périplasme et la membrane externe de la bactérie.

II.4.1.1 Les protéines de la membrane interne

Les anneaux de la membrane interne sont parmi les premiers à être assemblés (Kimbrough et Miller, 2002). Les progrès de la microscopie électronique ont permis d'obtenir des clichés de très bonne qualité de la base du système et notamment des anneaux de la membrane interne et externe chez *Salmonella enterica* à une résolution sub-atomique (≈ 10 Å) (Schraidt et Marlovits 2011).

Les auteurs montrent que chez cet organisme, deux anneaux concentriques se forment au sein de la membrane interne. Ces anneaux formés par PrgH et PrgK, (homologues respectifs de PscD et PscJ chez *P. aeruginosa*) possèdent chacun 24 sous-unités pour former un canal dont le diamètre externe est proche des 250 Å (Schraidt *et al.*, 2010). La figure 33 représente la modélisation de ces deux anneaux à partir des structures des protéines résolues par cristallographie aux rayons X (Figure 33).

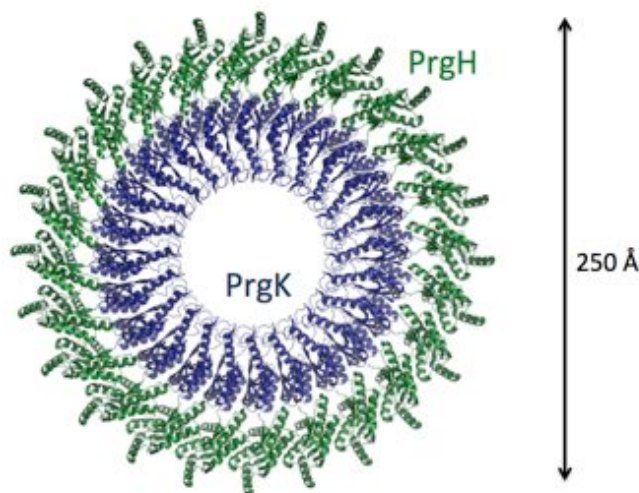


Figure 33: Modélisation de la structure formant les anneaux de la membrane interne chez *Salmonella*.

PrgK et PrgH s'assemblent pour former une structure concentrique possédant une symétrie d'ordre 24.

(D'après Schraidt et Marlovits, 2011)

Ces deux anneaux, situés dans la membrane interne, contactent la sécrétine qui possède une large région périplasmique, créant ainsi un canal continu du cytoplasme de la bactérie jusqu'à sa surface.

II.4.1.2 Les sécrétines

L'anneau de la membrane externe, qui se poursuit dans le périplasme est formé par une seule protéine appartenant à la famille des sécrétines. Les sécrétines sont des protéines

composées de plusieurs domaines N-terminaux généralement solubles appelés les « N-domains » ainsi qu'un domaine très conservé, membranaire, le « secretin-domain », (Korotkov *et al.*, 2011). Il existe des sécrétines dans de nombreux systèmes de sécrétion tels que les systèmes de sécrétions de type II, de type III, les pili de type IVa et IVb, ainsi que les bactériophages f1 (Figure 34).

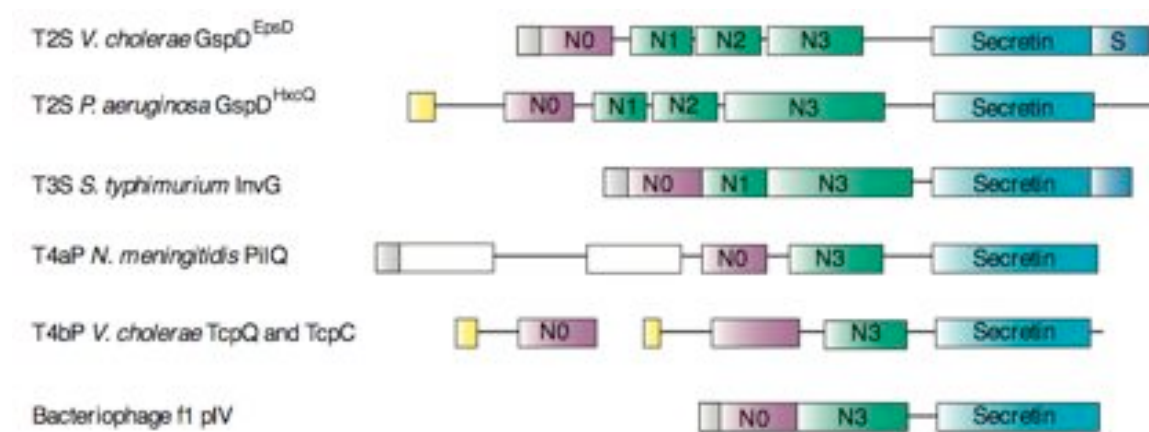


Figure 34:
Représentation schématique des sécrétines les plus étudiées par groupe de sécrétion.

Chaque sécrétine possède un domaine N0 (en violet) en N-terminal qui peut être dupliqué plusieurs fois. Le domaine N3 possède souvent une boucle supplémentaire (en vert). Le domaine conservé « secretin » est représenté en bleu avec en C-terminal un domaine « S » qui est le domaine d'interaction avec une lipoprotéine nécessaire à la fonctionnalité de la sécrétine.

Dans certains cas comme HxcQ du T2SS et TcpQ/TcpC du pili de type IVb, la sécrétine possède un site de lipodation interne qui la rend indépendante d'une lipoprotéine accessoire (en jaune).

Certains domaines de la sécrétine PilQ du T4bSS ne sont pas encore décrits (en blanc).

Les sécrétines forment dans la membrane externe des oligomères très stables, résistants pour la plupart au SDS. Différentes études ont reporté pour ces oligomères, un ordre de symétrie oscillant entre 12 et 15 (Figure 35) créant ainsi un canal suffisamment large pour permettre la sécrétion de protéines partiellement dépliées, (Chami *et al.*, 2005 ; Hodgkinson *et al.*, 2009 ; Schraidt et Marlovits., 2011).

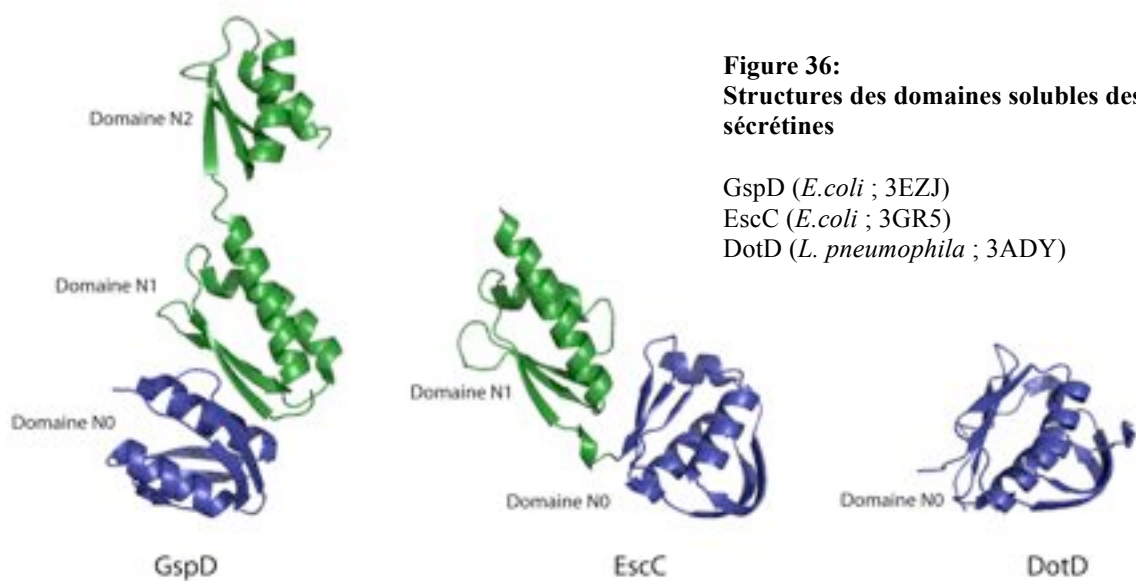


Figure 35: Modélisation de la structure formée par le 15-mères de sécrétine InvG chez Salmonella.

La microscopie électronique a révélé une organisation en anneau composé de 15 monomères de sécrétine. Ici, seul les domaines N0-N1 sont représentés.

(D'après Schraidt et Marlovits , 2011)

Actuellement, il n'existe que trois structures cristallographiques de domaines de sécrétine ; il s'agit des domaines solubles « N » de GspD, EscC et DotD appartenant respectivement aux systèmes de sécrétion de type II et III de *E. coli*, et au système de sécrétion de type IVb de *Legionella pneumophila* (Spreter *et al.*, 2009 ; Korotkov *et al.*, 2009 ; Nakano *et al.*, 2010). Comme on peut le voir dans la figure 36, les domaines « N » sont très similaires avec une architecture $\beta\alpha\beta\alpha\beta\beta$, retrouvée chez différentes protéines du T3SS impliquées dans la formation d'oligomères (Spreter *et al.*, 2009).



L'analyse de l'agencement des domaines entre eux montre de grandes différences. En effet, la superposition des domaines N1 de EscC avec GspD rend compte d'un angle de plus de 143 degrés entre les domaines N0 (Figure 36). Bien que ceci puisse être dû à la contrainte imposée par l'empilement cristallin, les auteurs proposent plutôt que cette flexibilité soit une caractéristique des sécrétines dont la flexibilité est essentielle au fonctionnement du système de sécrétion de type III (Marlovits *et al.*, 2006). De nombreux défis restent à relever concernant l'étude des sécrétines. L'un d'entre eux est évidemment la résolution de la structure d'une sécrétine complète avec le domaine membranaire mais il est aussi important de comprendre les mécanismes moléculaires d'oligomérisation et d'adressage à la membrane externe. En effet, la plupart des sécrétines ne peuvent pas s'insérer dans la membrane externe sans l'aide de lipoprotéines spécifiques appelées « pilotines » (Guilvout *et al.*, 2006). Le rôle des pilotines est essentiel dans la biogenèse de nombreux systèmes de sécrétion. C'est

notamment le cas pour les systèmes de sécrétion de type III. Au sein des sécrétines, la région la moins conservée parmi les différents homologues est très souvent la région responsable de l'interaction pilotine-sécrétine. Cette question m'a beaucoup intéressé lors du déroulement de ma thèse (voir ci-dessous).

II.4.1.3 Les pilotines

Les pilotines sont des petites lipoprotéines dont la séquence est très peu conservée au sein des différents organismes et des différents systèmes. Cependant, les pilotines possèdent toutes certaines caractéristiques communes. Ce sont des protéines de faible poids moléculaire (≈ 15 kDa), avec un point isoélectrique (pI) élevé (> 9), un peptide signal en N-terminal avec un motif de lipidation classique LXGC pour lequel la lipidation se fait sur la cystéine. Bien que dans certains systèmes les sécrétines puissent atteindre la membrane externe sans l'aide de protéines accessoires (Viarre *et al.*, 2009), la majorité des sécrétines du système de sécrétion de type III nécessite une pilotine pour être fonctionnelles. En effet, il a été démontré qu'une pilotine était essentielle à la biogenèse du T3SS chez *Shigella flexneri* (Schuch et Maurelli, 1999 ; Schuch et Maurelli, 2001), de *Salmonella enterica* (Crago et Koronakis, 1998) et de *Yersinia enterocolitica* (Burghout *et al.*, 2004). Les études réalisées sur ces pilotines parviennent toutes à la même conclusion qui est que les pilotines aident la sécrétine à passer de la membrane interne à la membrane externe et à y oligomériser. La délétion de la pilotine YscW de *Yersinia enterocolitica* induit notamment une réduction du nombre d'oligomères de la sécrétine YscC (Burghout *et al.*, 2004) (Figure 37).

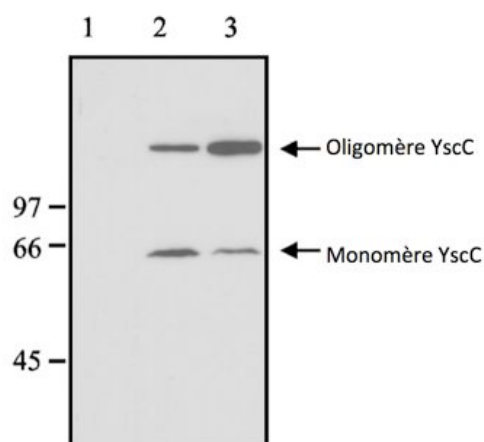


Figure 37: Analyse de la formation d'oligomères de YscC.

(1) : Contrôle

(2) : YscC seule

(3) : YscC + YscW

Les oligomères sont résistants au SDS.

(Burghout *et al.*, 2004)

La formation d'oligomères stables dans la membrane externe est une nécessité essentielle à la fonctionnalité des sécrétines. De ce fait, de nombreuses études, notamment structurales ont été menées sur ces protéines. Les pilotines ne sont pas une famille de protéines structuralement conservée (Figure 38), (Golovanov *et al.*, 2006 ; Okon *et al.*, 2008 ; Lario *et al.*, 2005 ; Trindade *et al.*, 2008 ; Koo *et al.*, 2008).

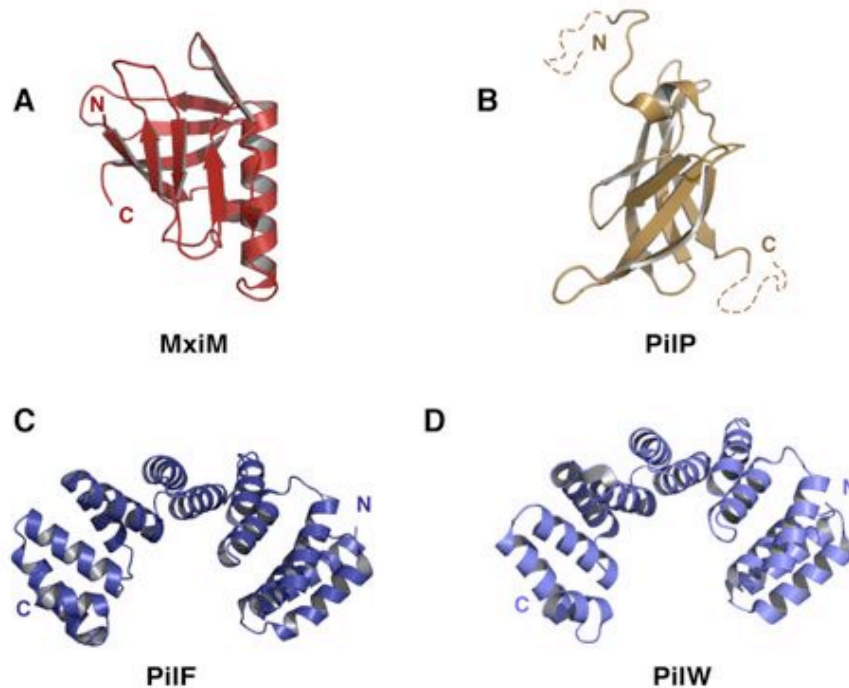


Figure 38: Structures des pilotines connues à ce jour.

A) MxiM (rouge) du T3SS de *Shigella flexneri*, (1Y9L).
 B) PilP (jaune) des pili de type IV chez *Neisseria meningitidis* (2IVW).
 C-D) PilF (bleu) et PilW (violet) des pili de type IV chez *Neisseria meningitidis* et *P. aeruginosa* respectivement. (2VQ2; 2HO1).

Chez *P. aeruginosa*, au sein du système de sécrétion de type III, un homologue de la pilotine de *Yersinia spp.* YscW a été identifié par alignement de séquence. Les deux protéines partagent plus de 60% de similarité de séquence. Cette protéine est ExsB et est d'autant plus intéressante qu'elle est codée par un opéron de régulation. L'identité de séquence partagée entre YscW et ExsB laisse penser que ExsB jouerait le rôle de pilotine pour le T3SS de *P. aeruginosa* (Allaoui *et al.*, 1995 ; Goranson *et al.*, 1997). L'étude structurale de cette protéine, permettrait non seulement de mieux comprendre la biogenèse du système de sécrétion de type

III chez *P. aeruginosa* mais, étant conservée chez tous les organismes de la famille Ysc, permettrait aussi de lever l'ambiguïté sur la structure des pilotines de toute cette famille d'injectisomes. Il a été proposé que MxiM de *S. flexneri*, la seule pilotine du T3SS dont la structure est connue à ce jour, pouvait partager ses caractéristiques structurales avec toutes les pilotines présentes au sein des 7 familles d'injectisomes (Lario *et al.*, 2005). Une fois encore, la structure de ExsB permettrait de valider ou d'infirmer cette hypothèse.

II.4.2 L'aiguille de sécrétion

Chez *Pseudomonas aeruginosa* l'aiguille de sécrétion est formée par l'autopolymérisation d'une unique protéine de 9 kDa, PscF. Comme on peut le voir sur la figure 39, l'aiguille mesure environ 50 nm de longueur pour un diamètre interne de 25 Å (Pastor *et al.*, 2005).

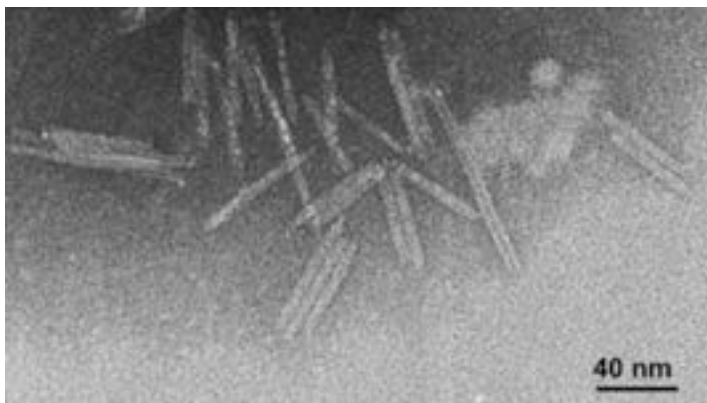


Figure 39: Aiguilles purifiées du T3SS de *P. aeruginosa* observées par microscopie électronique à transmission

(Pastor *et al.*, 2005)

Ce faible diamètre interne nécessite que les protéines soient dans un état semi-dépliées pour pouvoir transiter à travers l'aiguille. Ceci est assuré par les chaperonnes qui maintiennent leurs substrats dans un état compétant pour la sécrétion (Stebbins et Galan, 2001).

Au sein du cytoplasme bactérien, PscF est en complexe avec deux protéines chaperonnes, PscE et PscG qui stabilisent la forme monomérique (Quinaud *et al.*, 2005). La structure du complexe heterotrimérique (PscE : PscF : PscG) a été résolu au laboratoire révélant le mode d'interaction de PscF avec ses deux chaperonnes (Quinaud *et al.*, 2007). Ce complexe est détaillée dans la section dédiée aux chaperonnes de ce manuscrit.

II.4.3 Le pore de translocation

Le pore de translocation est la partie la plus distale du T3SS. Il permet le prolongement du canal formé par l'aiguille de sécrétion jusqu'au cytoplasme de la cellule hôte. Le pore est formé par l'oligomérisation de 3 protéines (Matteï *et al.*, 2010) dont un translocateur hydrophile (PcrV), un translocateur hydrophobe majeur avec deux domaines transmembranaires (PopB) et un mineur avec un seul domaine transmembranaire prédit (PopD) (Goure *et al.*, 2004).

Le translocateur hydrophile PcrV, aussi nommé « antigène V » de part sa capacité à induire la production d'anticorps protecteurs contre *P. aeruginosa* en modèles animaux (Frank *et al.*, 2002) est localisé au sommet de l'aiguille. La structure alors formée sert de « plateforme d'assemblage » aux deux translocateurs hydrophobes et est essentielle à la toxicité du T3SS (Cornelis, 2006 ; Goure *et al.*, 2004).

Les translocateurs hydrophobes PopB et PopD oligomérisent pour former des pores dans les membranes eucaryotes dont les caractéristiques structurales sont encore peu connues. La stoechiométrie exacte du pore ainsi que l'agencement des deux translocateurs entre eux sont encore peu compris mais les études de microscopie électronique sur des particules isolées ont permis de mettre en évidence un diamètre interne et externe de 2.5 nm et 8 nm respectivement (Schoehn *et al.*, 2003). De nombreuses études structurales sont menées sur les translocateurs, mais étant partiellement non structurés, ces protéines restent un défi pour les structuralistes. Une revue sur le pore de translocation, pour laquelle je suis co-auteur est disponible à la fin de ce manuscrit (Matteï *et al.* 2010).

II.4.4 Régulation de la sécrétion

Depuis plusieurs années, de nombreux groupes essayent de comprendre la régulation de la sécrétion du T3SS. La question fondamentale est : « Quels sont les mécanismes qui régissent la sécrétion ordonnée des substrats par le système ? » Deux mécanismes, sans doute complémentaires, semblent régir cette hiérarchie.

II.4.4.1 La protéine « switch »

Une famille de protéines semble jouer un rôle primordial dans l'organisation temporelle de la sécrétion. Il s'agit de la famille des homologues de PscU (YscU, SpaS, EscU et Spa40 chez *Yersinia*, *Shigella*, *E. coli* et *Salmonella* spp., respectivement). Les protéines de cette famille sont localisées à la base du système et interagissent avec les substrats devant

être sécrétés. Plusieurs groupes ont montré que ces protéines subissent une protéolyse spontanée au niveau de leur domaine C-terminal (Lavander *et al.*, 2002 ; Zarivach *et al.*, 2008) et il semblerait que cette modification implique un changement de structure suffisant pour modifier la sécrétion des substrats. Les analyses de mutations du motif impliqué (NPTH) démontrent qu'un mutant non fonctionnel pour la protéolyse ne permet pas la sécrétion de l'ensemble des effecteurs. En effet, concernant EscU/SpaS, le système est incapable de sécréter les protéines formant l'aiguille (Zarivach *et al.*, 2008) alors que des mutations équivalentes dans YscU (chez *Yersinia* spp.) permettent la sécrétion des protéines de l'aiguille mais pas des translocateurs (Sorg *et al.*, 2007). Cela suggère qu'un signal induise la protéolyse de YscU, permettant ainsi au système de passer à la sécrétion d'un autre type de substrat.

II.4.4.2 La plateforme de tri

Très récemment, le groupe de Jorge Galán a prouvé l'existence d'une « plateforme de tri » capable de contrôler séquentiellement la sécrétion des différentes protéines du système (Lara-tejero *et al.*, 2011). Cette plateforme formée par SpaO-OrgA-OrgB chez *Salmonella enterica* (homologues de PscQ-PscK-PscL chez *P. aeruginosa*) est en effet capable de déterminer le type de protéines à sécréter en fonction de « l'état » d'assemblage du système. Ainsi, lorsque l'aiguille de sécrétion est formée, le système est à l'arrêt. Les trois translocateurs sont alors prêts à être sécrétés et sont chargés sur la plateforme de tri, attendant le signal d'adhésion à une cellule-cible pour être sécrétés. Les expériences menées sur ce système ont mis en évidence, que la délétion des translocateurs mimait un système fonctionnel (où ceux-là ne sont plus en attente de sécrétion mais déjà en place). L'étude de la composition de la plateforme de tri dans ces conditions démontre la mise en place des toxines au sein de la plateforme en vue de leur sécrétion. La plateforme de tri est donc responsable de l'ordre de sécrétion des différentes protéines du T3SS. Les mêmes auteurs montrent que l'ATPase InvC du T3SS de *S. enterica* fait partie de la plateforme de tri, jouant certainement un rôle important dans la dissociation du complexe chaperonne-cargo et transfert du cargo sur la plateforme.

Couplées l'une à l'autre, ces deux techniques développées pour « hiérarchiser » la sécrétion des substrats permet à la bactérie une biogenèse et un fonctionnement optimal du Système de Sécrétion de Type III.

II.4.5 Les toxines du système de sécrétion de type III chez *P. aeruginosa*

P. aeruginosa ne secrète que quatre toxines via l'injectisome : ExoS, ExoT, ExoU et ExoY, contrairement à *Yersinia* spp., *Salmonella* spp. et *Shigella* spp. qui peuvent respectivement sécréter six, treize et vingt-cinq toxines différentes (Hauser 2009). Il est cependant intéressant de noter que bien que les gènes codants pour la biogénèse du système (comme l'ATPase par exemple) soient conservés chez toutes les souches de *P. aeruginosa*, les gènes codant pour les toxines ne sont pas présents de façon identique. En effet, le gène *exoT* est présent dans près de 100% des souches puis vient *exoY* (90%), *exoS* (72%) et pour finir *exoU* (28%). Pour une raison encore non comprise, il n'existe pratiquement aucune souche exprimant à la fois ExoU et ExoS (Feltman *et al.*, 2001 ; Hauser 2009). ExoS, ExoT, ExoU et ExoY possèdent différentes fonctions qui sont résumées dans la figure suivante (Figure 40) :

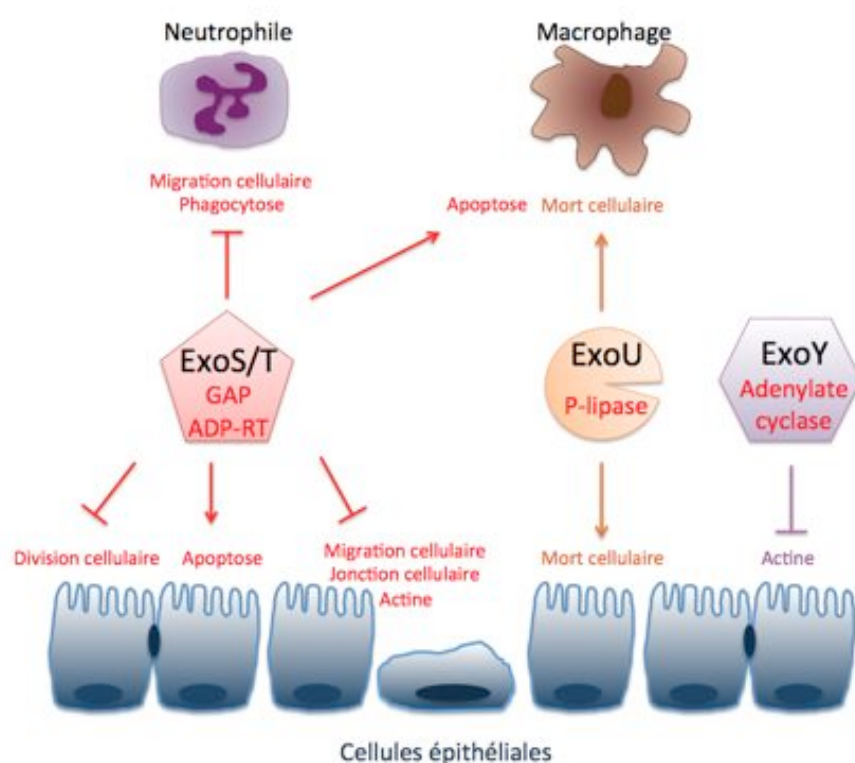


Figure 40: Effet des différentes toxines sur les cellules eucaryotes.

Les quatre toxines ExoS, ExoT, ExoU et ExoY ciblent différents types cellulaires et possèdent des fonctions précises.
(Engel et Balachandran, 2009)

GAP : GTPase Activating Protein
ADP-RT : ADP-Ribosyl Transferase
P-lipase : Phospholipase

ExoU possède une activité phospholipase de type A2 à large spectre. Elle présente des homologies de séquence avec la patatine, une phospholipase de plante et possède un site catalytique indépendant du calcium comme certaines phospholipases de mammifères

(Sitkiewicz *et al.*, 2006). Pour être fonctionnelle, ExoU nécessite un cofacteur, la Super Oxide Dismutase I (SOD-I) mais l'activité de cette enzyme n'est pas nécessaire à celle d'ExoU (Sato *et al.*, 2006). De plus, il a été reporté qu'ExoU était ubiquitinilée à son entrée dans la cellule eucaryote. Cependant, cette modification post traductionnelle n'affecte pas la dégradation de l'enzyme et sa signification biologique est encore incertaine; ExoU est doublement ubiquitinilée sur la lysine en position 178 (Stirling *et al.*, 2006). Contrairement aux autres toxines, ExoU entraîne une mort rapide (1 à 2 heures) des macrophages et des cellules des épithélia, permettant ainsi à la bactérie de survivre dans l'hôte et même de s'y disséminer (Hauser, 2009).

ExoS et ExoT sont deux enzymes très proches génétiquement (76% d'identité de séquence) et possèdent les mêmes fonctions. Ce sont des enzymes bi fonctionnelles possédant une activité GAP (GTPase Activating Protein) et une activité ADPRT (ADP-Ribosyl Transférase). De part ces deux activités, ExoS et ExoT sont impliquées dans de nombreux dysfonctionnements cellulaires allant de la dépolymérisation du cytosquelette d'actine jusqu'à l'apoptose. Certaines petites GTPases comme Rho, Rac et CDC42 sont impliquées dans le maintien du cytosquelette d'actine et leur activation médiée par le domaine GAP d'ExoS/T implique la dépolymérisation du cytosquelette d'actine (Pederson *et al.* 1999). Cette fonction est très importante car privées de cytosquelette, les macrophages ne peuvent plus phagocyter les bactéries et les cellules épithéliales s'arrondissent, créant ainsi des portes d'entrée vers les tissus profonds (Engel et Balachandran, 2009). De même que le domaine GAP, le domaine ADPRT de ExoS/ExoT est impliqué dans le dysfonctionnement de la synthèse d'ADN (Fraylick *et al.*, 2001), du trafic vésiculaire et de l'endocytose (Hauser, 2009) conduisant à l'apoptose des cellules. Il est ici nécessaire de noter que le domaine ADPRT de ces deux toxines nécessite une activation par les protéines eucaryotes 14.3.3 (Ottmann *et al.*, 2007).

La description des toxines ExoS/ExoT et ExoU met en avant un caractère commun. D'une part, chacune de ces trois toxines est produite dans la bactérie en complexe avec une chaperonne qui la séquestre et la garde dans un état compétant pour la sécrétion, et d'autre part, les toxines ne sont complètement actives qu'en présence d'un cofacteur eucaryote (SOD1 pour ExoU et les protéines 14.3.3 pour ExoS/T). Il est donc tentant d'émettre l'hypothèse que cette dépendance est un moyen supplémentaire développé par *P. aeruginosa* pour se protéger de ces propres toxines.

La toxine ExoY est un peu différente des trois autres car elle ne possède aucune chaperonne spécifique identifiée à ce jour pour inhiber son activité au sein de la bactérie. Cependant, comme ExoS, ExoT et ExoU, elle possède un cofacteur eucaryote dont la nature n'a pas été déterminée (Hauser, 2009). ExoY est une adénylate cyclase et son activité entraîne donc l'augmentation d'AMP cyclique au sein de la cellule cible. Cela induit principalement la dépolymérisation du cytosquelette d'actine (Cowell *et al.*, 2005).

Comme on peut le voir, avec seulement quatre toxines, *P. aeruginosa* est capable d'inhiber les fonctions de phagocytose des cellules de l'immunité et même d'induire leur lyse, mais aussi de dégrader les épithélia pour atteindre les tissus profonds et se disséminer dans l'organisme.

Au sein du cytoplasme bactérien, comme mentionné précédemment, les effecteurs du T3SS sont en complexe avec des chaperonnes spécifiques. Le paragraphe suivant a pour but de décrire ces protéines essentielles.

II.4.6 Les chaperonnes du T3SS

Les chaperonnes du T3SS sont de petites protéines acides jouant un rôle clé pour la biogénèse et la fonctionnalité du système. Leur fonction est primordiale, d'une part pour empêcher les toxines d'exercer leurs fonctions au sein de la bactérie et d'autre part pour garder les protéines dans un état compétent pour la sécrétion. Selon le type de substrat qu'elles reconnaissent les chaperonnes ont été groupées en 3 classes (Cornelis, 2006 ; Parsot *et al.*, 2003). Les chaperonnes de classe IA et IB reconnaissent respectivement une ou plusieurs toxines, les chaperonnes de classe II reconnaissent les translocateurs (par exemple, PcrH de *Pseudomonas aeruginosa* reconnaît à la fois PopB et PopD) (Job *et al.*, 2010), enfin les chaperonnes de classe III reconnaissent spécifiquement la protéine formant l'aiguille de sécrétion (Quinaud *et al.* 2007).

Les chaperonnes de classe I possèdent toutes une structure dimérique en forme de coeur avec une hélice de dimérisation à l'interface. Les toxines s'enroulent autour de ce coeur sous forme partiellement dépliée.

Les chaperonnes de classe II et III, comme PcrH (Job *et al.*, 2010) ou PscE:PscG (Quinaud *et al.*, 2007), bien qu'interagissant avec des protéines ayant des fonctions totalement différentes, possèdent une structure très similaire (Figure 41). En effet, le repliement qu'elles adoptent est appelé TPR (pour Tetratricopeptide-Repeat) et forme une structure en « paume de main » créant une cavité dans laquelle la protéine substrat se lie (Figures 41 et 43).

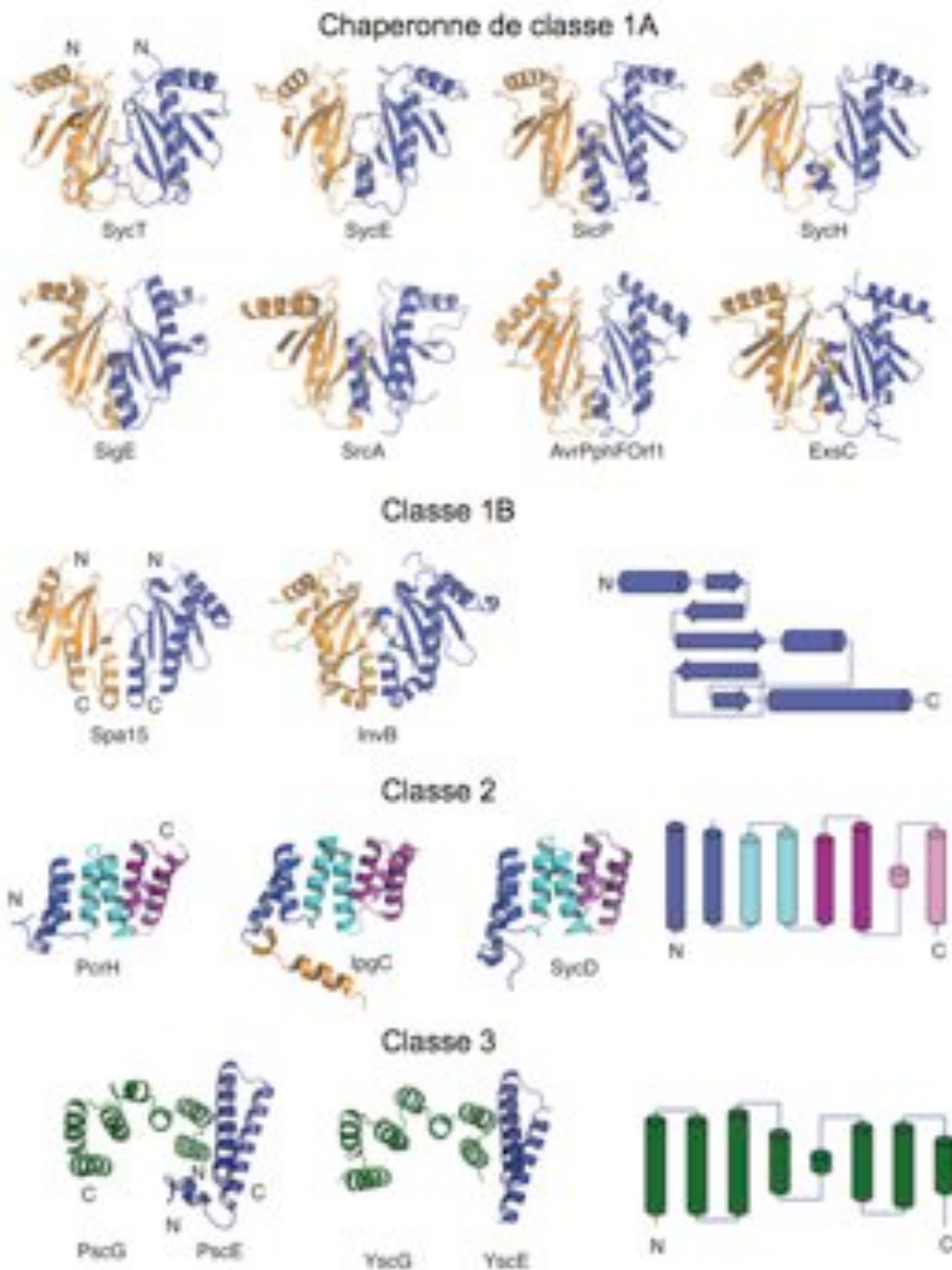


Figure 41: Galerie de chaperonnes du système de sécrétion de type III

Les chaperonnes de classe I partagent toutes le même repliement en forme de cœur alors que les chaperonnes de classe 2 et 3 possèdent un repliement de type TPR.

Codes PDB : SycT (2BSJ), SycE (1JYA), SicP (1JYO), SycH (1TTW), SigE (1K3S), SrcA (3EPU), AvrPphF (1S28), ExsC (3KXY), Spa15 (1RY9), InvB (2FM8), PcrH (2XCB), IpgC (4GZ2), SycD (2VGX), PscE-PscG (2UWJ) et YscE-YscG (2P58). (Izoré *et al.*, 2011)

Il semblerait que le rôle joué par ces protéines ne soit pas limité au rôle de chaperonne au sens strict du terme. En effet, il a été montré qu'elles sont capables de réguler l'ordre de sécrétion des effecteurs (Birtalan *et al.*, 2002) et qu'elles sont essentielles pour diriger leurs « cargos » jusqu'au niveau de l'appareil de sécrétion où elles interagissent avec l'ATPase et plus généralement avec la plateforme de tri (Lara-tejero *et al.*, 2011). Bien que ces chaperonnes possèdent une structure très similaire, encore aucune séquence consensus ou structure particulière n'a été identifiée permettant d'expliquer l'interaction avec le complexe ATPase ou la plateforme de tri.

II.4.6.1 Mode de liaison des effecteurs (toxines, aiguilles, translocateurs).

Au cours des dernières années, un effort particulier a été fourni par les chercheurs en biologie structurale et de nombreuses structures de chaperonnes en complexe avec leurs effecteurs ont été résolues. L'étude de ces complexes met en évidence trois modes de liaison différents, un pour chaque classe de chaperonnes.

Chaperonnes de classe IA et IB :

Le groupe d'Erec Stebbins a découvert en 2006 que de très nombreuses toxines de différents pathogènes (*Yersinia* spp., *Salmonella* spp, *Shigella* spp., *E. coli* et *Pseudomonas* spp.) possèdent un motif de petite taille particulièrement conservé. Ce motif représente un brin bêta capable d'interagir de façon antiparallèle avec le premier brin bêta ($\beta 1$) de la chaperonne (Figure 42). Les expériences de mutations sur ce motif ont conduit à la dissociation du complexe étudié (Lilic *et al.*, 2006) prouvant ainsi son importance.

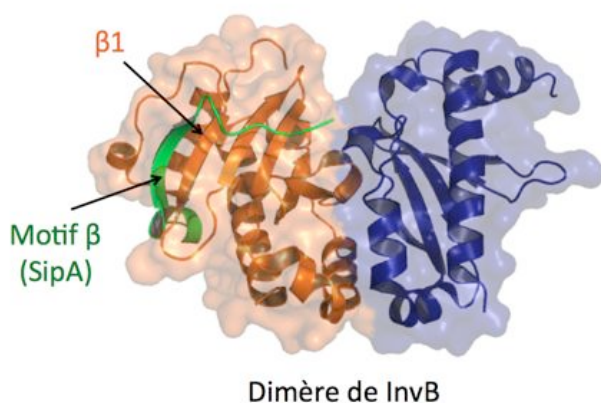


Figure 42: Structure du complexe InvB-SipA de *Salmonella enterica*

InvB forme un dimère (orange et bleu) et possède une cavité pouvant accommoder le « motif bêta » (vert) de la toxine Sip (Lilic *et al.*, 2006). Par souci de clarté, le domaine principal de SipA a été supprimé.

Chaperonnes de classe II et de classe III:

Les chaperonnes de classe II et de classe III, sont traitées ici dans le même paragraphe car leurs structures sont similaires. Cependant, le mode d'interaction qu'elles utilisent pour lier leurs substrats respectifs (les translocateurs pour la classe II et les protéines formant l'aiguille pour la class III) est différent. En effet, au sein du Groupe de Pathogénie Bactérienne de l'IBS, les structures de PcrH, chaperonne de classe II, en complexe avec un peptide du translocateur mineur PopD (Job *et al.*, 2010) ainsi que PscE :PscG, chaperonnes de classe III, en complexe avec PscF (Quinaud *et al.*, 2007), ont été résolues. Comme mentionné plus haut, PcrH ainsi que PscE :PscG possède un repliement TPR, structure formant une cavité dans laquelle le partenaire peut venir se lier. Cependant, les chaperonnes de classe II lient leurs substrats sous forme « dépliée » (Figure 43,A) alors que les substrats des chaperonnes de classe III possèdent une hélice amphipatique en C-terminal capable de se lier à la face concave du TPR. Dans ce dernier cas, PscG est la chaperonne principale, celle qui interagit avec PscF ; PscE pourrait donc servir à la stabilisation de PscG (Quinaud *et al.*, 2007). (Figure 43, B).

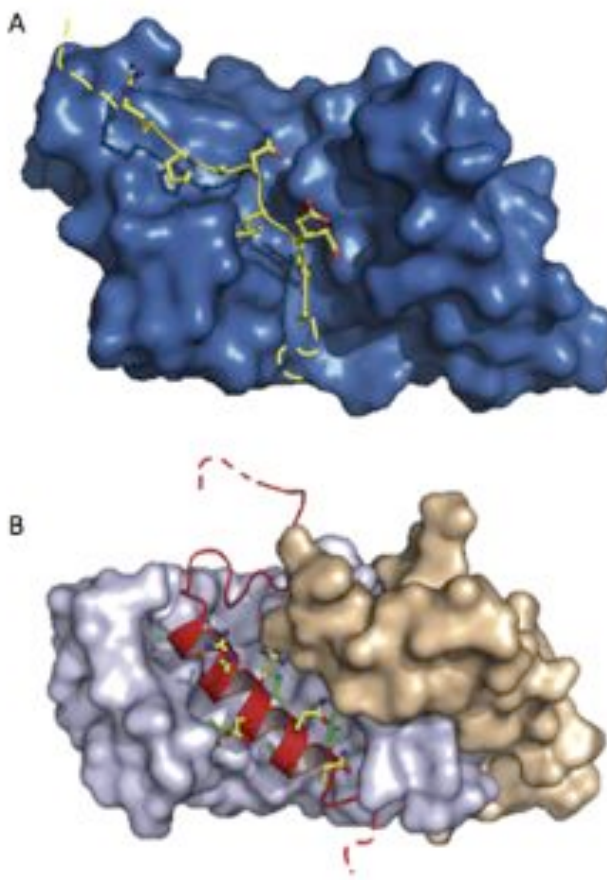


Figure 43: Structure des complexes PcrH : PopD et PscE : PscG : PscF de *Pseudomonas aeruginosa*.

A. PcrH (bleu) se replie selon un motif TPR, formant une cavité au sein de laquelle le peptide de PopD (jaune) vient se fixer sous forme dépliée.

B. Le complexe de chaperonne PscE : PscG (marron et bleu clair, respectivement) forme aussi une structure en TPR, que PscF reconnaît via une hélice amphipatique.

(Job *et al.*, 2010 ; Quinaud *et al.*, 2007)

Des structures similaires ont été résolues pour *Aeromonas salmonicida* et *Yersinia* spp. (Chatterjee *et al.* 2011 ; Sun *et al.*, 2008 ; Lunelli *et al.*, 2009) confirmant ces modes de liaison. Etant conservées au sein des différentes familles de Système de Sécrétion de Type III, les interactions chaperonne-effecteur pourraient rapidement devenir des cibles privilégiées pour le développement de molécules inhibitrices (Izoré *et al.*, 2011). Un des rôles clé de ces chaperonnes et de « diriger » leurs substrats jusqu'à l'ATPase du T3SS, lieu où le complexe chaperonne-substrat sera dissocié.

II.4.7 L'ATPase du système de sécrétion de type III

L'ATPase joue un rôle clé dans la biogenèse et l'activité du système puisqu'elle fournit l'énergie nécessaire à l'assemblage de l'injectisome et à la sécrétion des toxines. Comme mentionné précédemment, elle est impliquée dans la dissociation des protéines structurales et des toxines de leur chaperonnes respectives (Akeda et Galan, 2005). L'ATPase est localisée à la base du système sous forme oligomérique (Pozidis *et al.*, 2003). La stoechiométrie de l'ATPase *in vivo* n'est pas bien connue et semble diverger d'un organisme à l'autre. En effet, il est admis que l'ATPase hexamérise mais certaines évidences tendent à prouver que deux hexamères pourraient s'associer formant ainsi un dodécamère (Muller *et al.*, 2006). Il est ainsi proposé qu'un modèle hexamérique ne stimulerait que modérément l'hydrolyse de l'ATP, contrairement à un modèle dodécamérique qui serait bien plus actif (Akeda et Galan, 2004 ; Pozidis *et al.*, 2003). Le modèle dodécamérique est supporté par des clichés de cryomicroscopie électronique de l'ATPase HrcN de *P. syringae* acquis à une résolution de 16 Å et pouvant être expliqués par l'association face-à-face de deux hexamères (Figure 44)

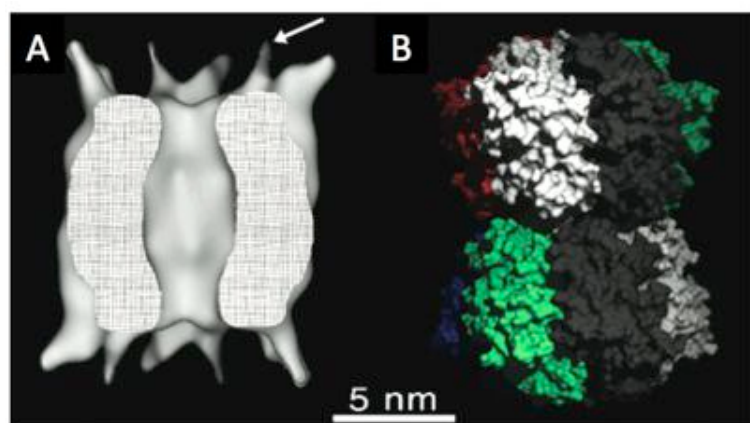


Figure 44.
HrcN s'assemble en dodécamère.

- A) Cliché de cryomicroscopie électronique de HrcN₁₂.
- B) Modélisation du dodécamère par assemblage de 2 hexamères.

(D'après Muller *et al.*, 2006)

II.4.7.1 Structure de L'ATPase EscN chez E. coli

La structure d'une forme tronquée de EscN a été résolue à 1,8 Å en 2007 par le groupe de N. Strynadka et montre de grandes similarités structurales avec la partie F1 des ATP synthases de type F0-F1 (Zarivach *et al.*, 2007). La construction utilisée pour les essais de cristallisation est une construction où les 102 premiers résidus de la protéine ont été supprimés. En effet, il a été montré pour InvC de *S. enterica* que la partie N-terminale formait un domaine d'association aux membranes et d'oligomérisation de l'ATPase (Akeda et Galan, 2004). Dans le but d'obtenir un échantillon soluble et homogène, les auteurs ont donc supprimé cette partie et ont modifié un acide aminé (V393P) pour obtenir une forme plus stable et augmenter la résolution de leur jeu de données. Ce résidu est aussi impliqué dans la liaison aux chaperonnes.

La structure révèle deux domaines fonctionnels : Un domaine catalytique et un domaine de liaison aux chaperonnes (Figure 45).

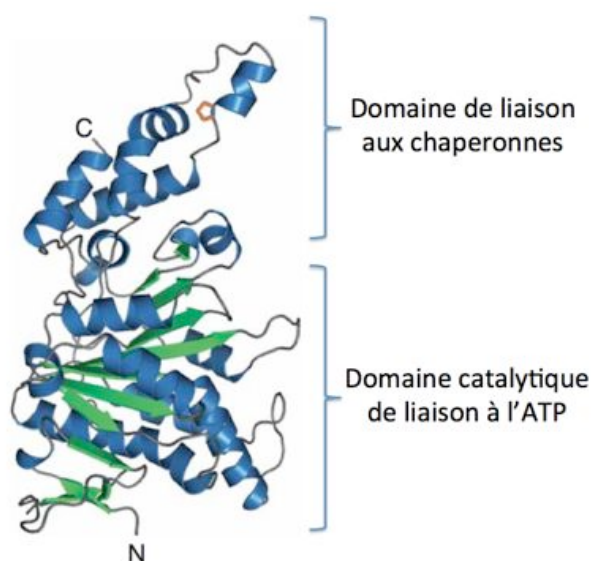


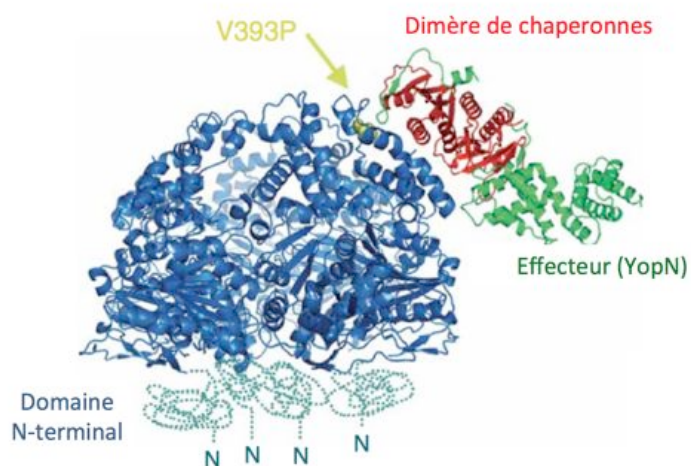
Figure 45 :
Structure de l'ATPase EscN
du T3SS de E. coli.

Les deux domaines formant la protéine sont représentés. En haut le domaine de liaison aux chaperonnes, en bas, le domaine « Rossmann fold » abritant le site catalytique. (Zarivach *et al.*, 2007).

Le domaine catalytique est un domaine de type « Rossmann fold » composé de 9 brins β parallèles entourés de 7 hélices α . Le site actif, déterminé par trempage des cristaux de EscN dans une solution d'ATP non hydrolysable (AMP-PNP), se situe au sein du motif de type Walker A, aussi appelé « P-Loop », au niveau des résidus 179 à 185. Ce motif très connu, mis en évidence dès 1982, est spécifique des protéines liant les nucléotides et notamment l'ATP et le GTP (Walker *et al.*, 1982).

Le deuxième domaine, celui de fixation aux chaperonnes est constitué de 5 hélices α . Comparé à la structure de la sous-unité α/β de la partie F1 des F0-F1 ATPase, ce domaine

n'est que peu conservé, ne partageant que 3 hélices en commun. Les auteurs proposent que cette région variable soit le site d'interaction de l'ATPase avec les chaperonnes du système de sécrétion de type III (Figure 46).



En se basant sur les mécanismes de changement de conformation subit par les ATPases F1, les auteurs proposent que l'hydrolyse de l'ATP au sein du domaine Rossmann fold puisse induire un changement de conformation au niveau du domaine de liaison aux chaperonnes et ainsi dissocier ces dernières du cargo qu'elles portent menant à sa sécrétion.

II.4.7.2 Une cible potentielle pour l'antibiothérapie

L'ATPase du T3SS est une des protéines les mieux conservées. Ainsi EscN partage 50% d'identité de séquence avec YscN (*Yersinia ssp.*), PscN (*P. aeruginosa*), et 45% avec InvC (*Salmonella spp.*) De plus, l'étude par rayons X de la structure de FliI, l'ATPase du système flagellaire montre que le flagelle et le T3SS possèdent une ATPase structuralement conservée (Imada *et al.*, 2007). De ce fait, l'ATPase est une cible potentielle pour l'antibiothérapie. En effet, l'inhibition de cette enzyme par des composés mimant par exemple l'ATP ou se liant au niveau du site d'interaction avec les chaperonnes, pourrait à terme permettre l'inhibition spécifique de la motilité (en ciblant FliI) et de la toxicité de très nombreux pathogènes humains (en inhibant ainsi la biogénèse du T3SS). Récemment, il a été montré que de petites molécules pouvaient inhiber l'action de l'ATPase YscN de *Yersinia pestis* (Swietnicki *et al.*, 2011), ouvrant la voie à une stratégie de développement d'antibiotiques.

II.4.7.3 Un partenaire pour l'ATPase : YscL ; PscL ...

L'ATPase du T3SS a souvent été mise en évidence en complexe avec de nombreuses protéines partenaires. En 2006, Blaylock décrit les protéines de la famille de YscL comme étant des inhibiteurs de l'ATPase du T3SS, caractéristique partagée par son homologue flagellaire FliH (Minamino et Macnab, 2000 ; Blaylock *et al.*, 2006). YscL forme un hétéro-trimère avec l'ATPase YscN et inhibe son activité « basale ». Aussi, les auteurs proposent que l'activité de l'ATPase *in vivo* soit stimulée de manière importante par les phospholipides de la membrane interne avec laquelle elle s'associe. De ce fait, l'ATPase n'est pas active dans le cytoplasme où elle est inhibée par YscL mais cette inhibition « faible » est balancée par une forte activité au niveau membranaire.

Récemment, il a été montré que la plateforme de tri, discutée plus haut, possède un homologue de YscL (Lara-tejero *et al.*, 2011). Il semblerait donc, que le rôle de YscL serait de diriger l'ATPase vers cette plateforme de tri et l'y ancrer via l'interaction YscL/YscN (Minamino *et al.*, 2009).

Il n'existe pour le moment aucune étude structurale sur les protéines de cette famille, mais l'analyse de la séquence de FliH et de YscL révèle des similarités intéressantes avec des protéines connues (Trost et Moore, 2009) (Figure 47).

A

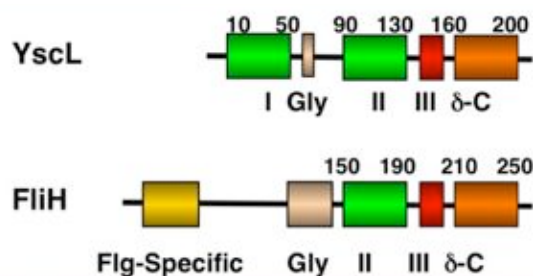


Figure 47:

A) Comparaison des structures de YscL du T3SS *Yersinia pestis* et de FliH du flagelle.

En jaune : une séquence spécifique du système du flagelle qui ne présente aucune homologie au sein du T3SS

En vert : Label I : séquence spécifique à YscL

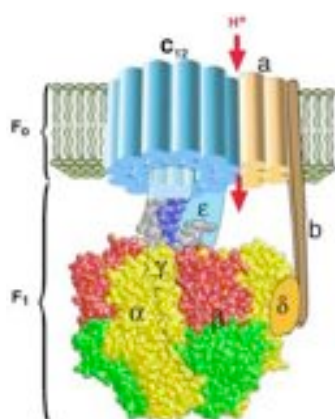
Label II : séquence homologue à la sous-unité b de l'ATPase F1.

En rouge : Séquence conservée entre les deux protéines mais sans homologues ou fonction connues.

En orange : Séquence homologue à la sous-unité delta de l'ATPase F1.

En doré : Séquence riche en glycines de fonction inconnue.

B



B) Représentation schématique de l'ATP synthase F0-F1

Les sous-unités b et δ delta forment le « stator » de l'ATP synthase. Les sous-unités α/ β forment l'hexamère catalytique. Les autres sous-unités forment le rotor et la partie membranaire F0.

(Wang et Oster, 1998)

En effet, il est prédit que FliH et YscL possèdent des domaines homologues aux domaines formant le stator de l'ATPase F0-F1 (Pallen *et al.*, 2006), (Figure 47). Ces sous-unités sont essentielles au fonctionnement de cette dernière, empêchant l'hexamère de tourner en même temps que le rotor (sous-unité γ et ϵ) d'où son nom.

III Objectif des travaux

Le système de sécrétion de type III est, sans nul doute, un des facteurs de virulence des plus importants pour *P. aeruginosa*. Privé de ce système, la bactérie possède une cytotoxicité fortement réduite. A ce titre, l'association française Vaincre La Mucoviscide finance de nombreux projets de recherche sur le T3SS, dont celui présenté dans ce manuscrit, dans le but de mieux comprendre son fonctionnement et ainsi, à terme, développer de nouvelles molécules à visée thérapeutique. L'objectif principal de cette partie de thèse est la caractérisation structurale et fonctionnelle de PscN, l'ATPase du T3SS, sous sa forme entière non clivée. En effet, comme expliqué précédemment, les études structurales menées sur l'homologue EscN chez *E.coli* ont été réalisées sur une version tronquée ($\Delta 102$) permettant d'obtenir une protéine monomérique soluble. Seule une modélisation d'hexamère à partir de la structure du monomère est actuellement disponible. L'objectif de cette thèse était donc la résolution de la structure de l'ATPase sous sa forme entière hexamérique ainsi que la compréhension de sa fonction au niveau de la plateforme de tri. A mon arrivée sur ce projet, aucune expérience n'avait été réalisée sur l'ATPase. Au cours de ces trois années de thèse, j'ai aussi travaillé sur une autre protéine du T3SS de *P. aeruginosa* : ExsB. ExsB est l'homologue de YscW : la pilotine du système de sécrétion de type III chez *Yersinia spp.* Il a été montré que YscW jouait un rôle très important dans la biogénèse du T3SS. Très peu de choses sont connues sur ExsB mais sa proximité génétique avec d'autres lipoprotéines du système Ysc rend son exploitation structurale et fonctionnelle très importante.

MATERIEL ET METHODES

I Biologie moléculaire

I.1 Clonage

I.1.1 Clonage : PscN, PscL et ExsB de *Pseudomonas aeruginosa*

Le clonage des gènes codant pour les protéines PscN, PscL et ExsB a été réalisé au sein de notre équipe. L'ADN génomique de la souche « PAO1 » de *P. aeruginosa* a servi de matrice d'amplification au cours d'une réaction de PCR. La région codant pour la protéine PscN (1-440) a été amplifiée et clonée dans différents plasmides en vue d'obtenir la protéine la plus soluble possible (Figure 62) :

pGEX-4T (GE Healthcare) : fusion GST pour augmenter la solubilité

pETDuet : expression de deux protéines en vu de former un complexe.

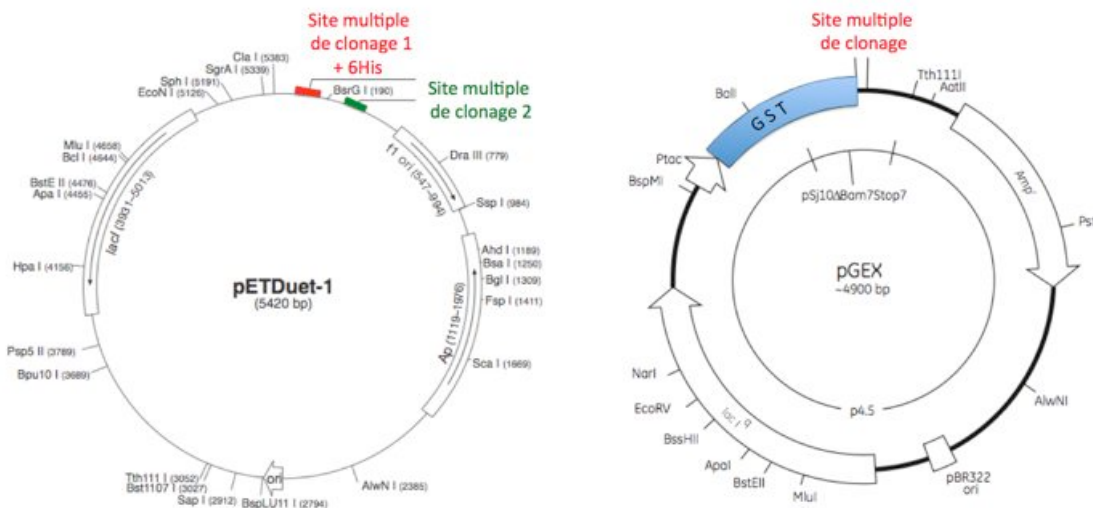


Figure 62 : cartes des vecteurs utilisés.

Le pETDuet permet le clonage de deux protéines avec une étiquette hexahistidine en N-terminal de la protéine clonée dans le premier site multiple de clonage.

Le pGEX permet le clonage d'une protéine en aval de la GST.

(Merck-chemicals.com et Novagen.com)

La séquence codante pour la protéine PscL (1-214) a été amplifiée et clonée dans un des sites de clonage vacant du pETDuet (Novagen). Le gène codant pour ExsB (17-141) a été cloné dans un vecteur pMAL-p2x modifié par V. Job au sein de notre groupe permettant l'ajout d'une étiquette hexa-histidine entre le peptide signal d'export périplasmique et la MBP

(Maltose Binding Protein) menant à la construction suivante (Figure 63). L'ajout de cette étiquette histidine permet d'augmenter le rendement de la purification.

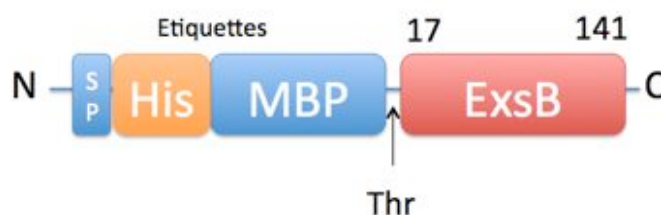


Figure 63: Construction utilisée pour l'expression de ExsB .

Le plasmide pMal-p2x a subi une mutagenèse permettant l'ajout d'une séquence 6-His entre le signal peptide d'export périplasmique de la MPB et le reste de la protéine (V. Job).

Les vecteurs ainsi formés ont ensuite été utilisés pour transformer des souches d'expression *Escherichia coli* BL21(DE3) (Novagen) (pETDuet, pGEX-4T) ainsi que ROSETTA-II (Novagen) (pMAL-p2x modifié).

I.1.2 Le plasmide pG-KJE6

Le plasmide pG-KJE6 (Figure 64) est un plasmide permettant la surexpression de protéines impliquées dans le repliement des peptides en cours de synthèse. La co-transformation de ce plasmide et d'un plasmide d'expression traditionnel (comme ceux cités plus haut) peut permettre de solubiliser les protéines produites en corps d'inclusion, insolubles ou agrégées (Nishihara *et al.* 1998).

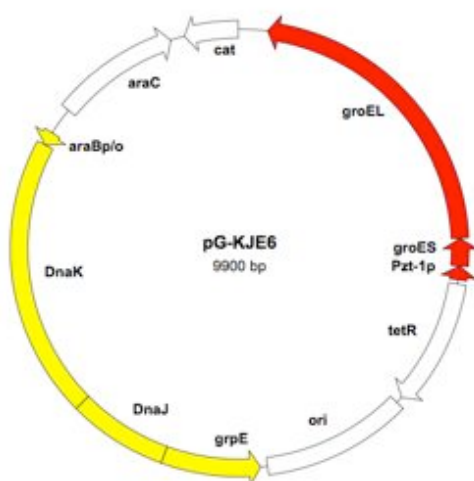


Figure 64: plasmide pG-KJE6

Ce plasmide encode deux groupes de chaperonnes impliquées dans le repliement sous forme native de protéines.

II Biochimie

II.1 Surexpression des protéines

II.1.1 Surexpression de la protéine PscN et du complexe PscN / PscL

Le protocole suivant a été établi pour l'expression de PscN et du complexe PscN : PscL

Une culture de cellules BL21-(DE3) en milieu LB (Luria-Bertani), supplémenté de ou des antibiotiques appropriés, est préparée en diluant une préculture à saturation au 1/20^{ème}. La croissance des bactéries est faite à 37°C sous agitation (200 rpm) jusqu'à ce que la culture atteigne une $DO_{600nm}=0,6$ U.A. L'expression de la protéine est alors induite par ajout de 0,3 mM d'IPTG (Euromedex) et 0,2% de glucose. Après 4 heures d'induction à 22°C, la culture est centrifugée à 4500 rpm pendant 30 minutes. Le culot bactérien est repris dans du tampon de lyse (20 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, pH 8,5, 0,1% Triton X-100, 10% Glycerol) additionné d'antiprotéases (1 mM de PMSF, 1 μ M de pepstatine, 1 μ M de leupeptine et 0,2 μ M d'aprotinine) pour être soniqué et clarifié par centrifugation pendant 45 minutes à 18000 rpm. 20 mM d'Imidazole sont ajoutés au tampon précédant dans le cas de l'expression de protéines en fusion avec une étiquette hexa-histidine.

Dans le cas de la co-transformation avec le pG-KJE6, l'induction des protéines chaperonnes est initiée à $DO_{600nm}=0,4$ U.A. par 0,5 mg/ml de L-arabinose (Sigma-Aldrich) et 10 ng/ml de tétracycline (Sigma-Aldrich). A $DO_{600nm}=0,6$ U.A, alors qu'une petite quantité de chaperonnes est déjà disponible, l'expression de la protéine d'intérêt est initiée par addition d'IPTG (0,3 mM).

II.1.2 Surexpression de la protéine PscL

La surexpression de PscL partage le même protocole que PscN. Cependant le détergent utilisé dans le tampon de lyse pour solubiliser la protéine est différent. En effet le tampon de lyse utilisé est : 20 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, pH 8,5, 1% CHAPS, 10% Glycerol, 20 mM Imidazole.

II.1.3 Surexpression de la protéine ExsB

Une culture de cellules ROSETTA II en milieu LB supplémenté de 100 µg/mL d'ampicilline (Euromedex) et de 34 µg/ml de chloramphenicol (Euromedex), est préparée en diluant une préculture à saturation au 1/20^{ème}. La croissance des bactéries est faite à 37°C sous agitation (200 rpm) jusqu'à ce que la culture atteigne une $DO_{600nm}=0,6$ U.A. L'expression de la protéine est alors induite par ajout de 1mM d'IPTG (Euromedex). Après 3 heures d'induction à 37°C, la culture est centrifugée à 4500 rpm pendant 30 minutes. Le culot bactérien est repris dans du tampon de lyse (20mM HEPES, 200mM NaCl, 1mM DDM, 20 mM Imidazole, pH 7,5). Après ajout de 1 mM de PMSF, 1 µM de pepstatine, 1 µM de leupeptine et 0,2 µM d'aprotinine, les cellules sont lysées par sonication (2 minutes de sonication par pulses de 2 secondes espacés de 10 secondes). Le lysat bactérien obtenu est ensuite centrifugé à 18000 rpm pendant 45 minutes afin de séparer les protéines solubles du matériel insoluble.

II.2 Purification des protéines d'intérêt

II.2.1 Chromatographie d'affinité

II.2.1.1 Etiquette hexa-histidine

Le surnageant, contenant les protéines solubles est incubé avec de la résine HisTrap ou déposé sur une colonne HisTrap (GE Healthcare) préalablement équilibrée avec le tampon de lyse. Après un lavage équivalent à 20 volumes de résine avec du tampon de lyse, les protéines sont éluées par un gradient en plusieurs paliers de 50, 150, 250 et 500 mM d'imidazole. Le contenu de chaque fraction d'élution est ensuite analysé sur gel SDS.

II.2.1.2 Etiquette GST

Le principe est identique à celui utilisé pour l'étiquette hexa-histidine. Le surnageant contenant les protéines solubles est déposé sur colonne GSTrap (GE Healthcare) préalablement équilibrée avec du tampon de lyse. Après un lavage équivalent à 10 volumes de résine, les protéines sont éluées avec 20mM de L-gluthatione réduit (Sigma-Aldrich).

II.2.2 Clivage des étiquettes

La protéine de fusion 6His-MBP-ExsB possède un site de reconnaissance à la thrombine (LVPGRS) situé entre la MBP et ExsB.

Les fractions contenant la protéine de fusion sont dialysées contre 20 mM HEPES, 200 mM NaCl, 20 mM Imidazole, pH 7,5 puis incubées 3 heures à température ambiante avec la thrombine (1 unité de thrombine par milligramme de protéine de fusion). L'activité de la protéase est ensuite inhibée par l'ajout de 1 mM PMSF. Les protéines clivées sont séparées des protéines non clivées par une nouvelle étape de chromatographie d'affinité.

II.2.3 Chromatographie d'exclusion de taille

Les fractions contenant la protéine d'intérêt sont déposées sur colonne d'exclusion de taille, préalablement équilibrée avec l'un des tampons suivants :

Pour PscN ou PscN : PscL : 20 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 0,05% Triton X100, 10% Glycerol, pH 8,5

Pour PscL : 20 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 0,55% CHAPS, 10% Glycerol, pH 8,5

Le contenu de chaque fraction d'élution est ensuite analysé sur gel SDS.

Une colonne Superdex 200 HR 10/30 (GE Healthcare) ou une colonne d'exclusion HiLoad 16/60 Superdex 200 (GE Healthcare) est utilisée suivant le volume de solution protéique à injecter.

II.2.4 Chromatographie échangeuse de cations

Les fractions contenant la protéine ExsB déléetée de son étiquette 6xHis-MBP sont dialysées 2 heures contre le tampon 20 mM HEPES, 20 mM NaCl, pH 7,5 et chargées sur colonne MonoS (Hitrap SP XL; GE HealthCare) pré équilibrée avec 20 mM HEPES, 20 mM NaCl, pH 7,5 et 1mM DDM. Après un lavage équivalant à 20 volumes de colonne, l'élution de la protéine est réalisée avec 20 mM HEPES, 500 mM NaCl, pH 7,5 et 1mM DDM à un débit de 0,1 ml/min. Cette colonne a pour but d'augmenter la pureté de l'échantillon mais aussi de concentrer la protéine.

II.3 Production des protéines sélénées

Une préculture en milieu LB est menée à saturation. Après centrifugation 15 minutes à 3500 rpm, le culot est lavé avec du milieu minimum M9 puis réutilisé pour ensemercer une deuxième préculture dans le milieu M9. Cette nouvelle préculture est ensuite diluée au 1/20^{ème}

pour ensemercer la culture finale sous agitation à 37°C. Lorsque la culture atteint une $DO_{600nm}=0,4$ U.A, les acides aminés sont ajoutés à la culture dans les proportions suivantes : Lysine, phénylalanine, thréonine = 100 mg/litre ; Isoleucine, leucine, valine = 50 mg/litre ; Sélénio-méthionine = 60 mg/litre. Tous les acides aminés doivent avoir une conformation « lévogyre » et sont ajoutés en poudre directement dans l'ermeneyer de culture. Lorsque la culture atteint $DO_{600nm}=0,6$ U.A, l'expression de la protéine est induite par 1 mM d'IPTG pendant 12 heures à 30°C.

La collecte des bactéries, la lyse ainsi que la purification des protéines sélénées sont similaires à celles des protéines natives.

II.4 Pontage chimique

La détermination de la stoechiométrie de PscL a été réalisée après dialyse de l'échantillon dans un tampon HEPES pH 7,5, 200 mM NaCl, 10% Glycerol et 0,55% CHAPS. La protéine a été incubée à température ambiante pendant 1 heure avec des concentrations croissantes d'acide subérique bis(3-sulfo-N-hydroxysuccinimide ester) (BS3, Sigma). Cette molécule a la propriété de ponter les amines libres des acides aminés (lysines) distants de 10 Å. La réaction est ensuite stoppée par ajout de 50mM Tris-HCl pH 8,0.

III Cristallographie aux rayons X

III.1 Cristallogenèse et collecte des données

III.1.1 Cristallogenèse de ExsB

Les expériences menées au HTXLab ont permis de mettre en évidence un nombre restreint de conditions pour la cristallisation de ExsB. La meilleure condition a été affinée au laboratoire. Des cristaux reproductibles ont été obtenus à 5mg/ml d'ExsB dans 0,1M TRIS-HCl, 1,5M $(NH_4)SO_4$, 0-10% glycerol.

III.1.2 Collecte des données de diffraction pour ExsB

Un premier jeu de données natif a été collecté à l'ESRF sur la ligne de lumière ID14-EH1. Dans un deuxième temps, un jeu de données sélénométhionylé a été collecté sur ID23-EH1 au pic du sélénium à 0,9792 Å (12,661 keV).

La structure de ExsB a été résolue par SAD en utilisant le jeu de données collecté au pic du sélénium, grâce au programme PHENIX (Adams *et al.*, 2010). Le modèle initial obtenu à 3,0 Å de résolution a été utilisé pour phaser un jeu de donnée natif à 1,8 Å en utilisant le programme PHASER. La maille est composée de trois molécules d'ExsB. Les facteurs R et R_{free} sont respectivement 21,60 et 25,90 en fin d'affinement.

RESULTATS

I PscN

A l'heure actuelle, l'étude de l'ATPase du système de sécrétion de type III sous sa forme entière reste encore un défi pour les structuralistes. En effet, son caractère insoluble et hydrophobe rend sa purification sous forme native très difficile. Au laboratoire, nous avons essayé de contourner ces difficultés en testant l'expression et la solubilité de PscN (48 kDa) fusionnée à différentes étiquettes (GST et hexahistidine) ainsi qu'en présence ou absence de son partenaire PscL.

I.1 Purification

I.1.1 GST-PscN

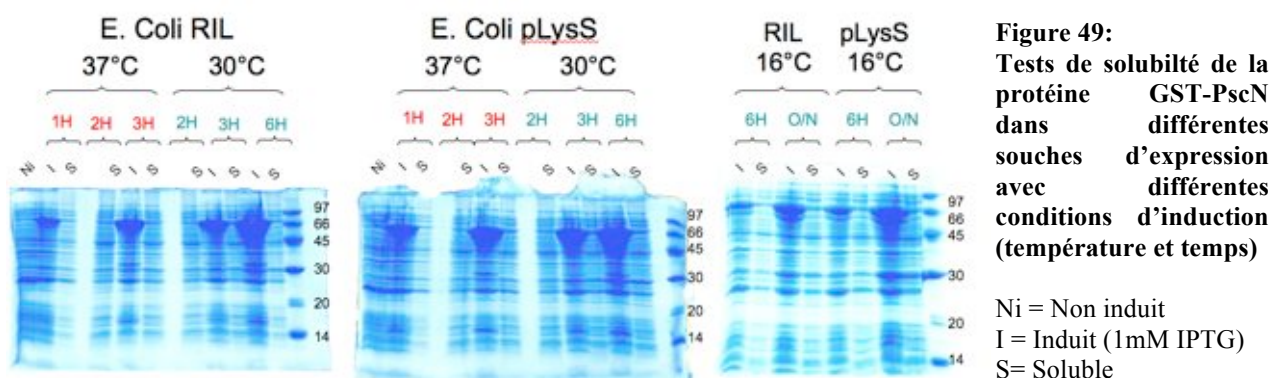
Un clone de PscN a été créé en fusion avec l'étiquette GST (Glutathione-S-Transferase) en position N-terminale (Figure 48) via un plasmide pGEX-4T. Le choix de cette étiquette a été dicté par le fait que la GST est une protéine très soluble qui peut, dans certains cas, augmenter la solubilité de la protéine avec laquelle elle est fusionnée. Les souches d'expression, BL21 DE3-RIL et pLysS, ont été testées pour différentes conditions d'expression (différents temps et différentes températures).



Figure 48:
Schéma de la protéine de
fusion GST-PscN
28 + 48 = 76 kDa

Le test de solubilité de la protéine de fusion a été réalisé suite à une induction à 1mM d'IPTG. Après différents temps, les cellules ont été lysées par sonication dans un tampon contenant 20 mM Tris-HCl pH 8,5 et 500 mM NaCl.

Les résultats obtenus ne sont pas convaincants. En effet, comme on peut le voir sur le gel SDS-15% de la figure 49, l'expression de la protéine de fusion est très bonne (I = Induit) mais il n'est pas clairement possible d'observer une bande correspondant à GST-PscN dans les fractions solubles (S), et ce quelque soit la température et le temps d'induction.



Ce problème de solubilité étant connu pour les ATPases du système Ysc notamment (*P. aeruginosa*, *Yersinia* spp.), nous avons testé différents tampons de lyse. En effet, nous avons essayé de solubiliser PscN dans des tampons dont le pH était très éloigné du point isoélectrique de la protéine (technique du choc de pH), sans succès. Nous avons également testé l'effet des détergents sur la solubilité de l'ATPase mais bien qu'appartenant à des familles chimiques différentes, les détergents utilisés (β -Octyl-glucoside ; Triton X-100 ; CHAPS ; Dodécylmaltoside ; C12E8 ; LAPAO, LDAO) n'ont pas apporté de changement significatif. Nous avons donc recherché un autre moyen de solubiliser la protéine et nous avons pris connaissance du plasmide pG-KJE6 de chez Takara Bio qui pourrait aider à la solubilité de la protéine.

I.1.2 GST-PscN + chaperonnes

Ce plasmide comporte deux groupes de chaperonnes, (DnaK, DnaJ, GrpE et GroES, GroEL), impliquées séquentiellement dans le repliement des protéines et pourraient potentiellement aider à la stabilité de l'ATPase en favorisant le repliement correct de la protéine (Nishihara *et al.*, 1998). Comme indiqué par le fournisseur, l'expression des chaperonnes du plasmide est induite légèrement plus tôt que la protéine d'intérêt dans le but de constituer un stock de chaperonnes au moment où l'expression de la protéine de fusion sera à son tour induite.

Après la mise au point du protocole d'induction, un test comparatif de solubilité a été réalisé afin de valider l'effet des chaperonnes sur la solubilité de GST-PscN (Figure 50).

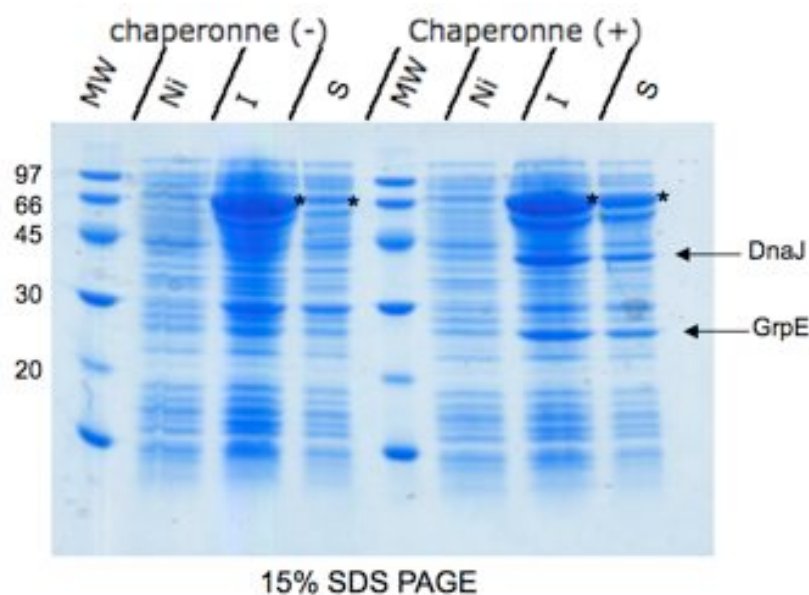


Figure 50: Test comparatif de la solubilité de GST-PscN en absence (-) et en présence (+) des protéines chaperonnes.

MW : poids moléculaire
Ni : Non induit
I : Induit
S : Soluble.

Les chaperonnes solubilisent GST-PscN (repérée avec *).

Le gel ci-dessus met en évidence que l'expression des chaperonnes permet à GST-PscN d'être beaucoup plus soluble (repérée sur le gel par *). Cependant, cette solubilité apparente n'est que peu satisfaisante puisque les chaperonnes du plasmide pG-KJE6 restent accrochées sur GST-PscN après purification. De très nombreux tests ont été effectués pour essayer de séparer ces protéines de la protéine d'intérêt (Gel filtration, [NaCl], détergents, urée) malheureusement sans succès.

Ces expériences mettent en évidence la difficulté de travailler avec des protéines associées à la membrane qui possèdent des régions hydrophobes essentielles à l'interaction membrane-protéine et qui limitent leur solubilité.

Le souhait de l'association qui finance nos travaux est de découvrir un moyen d'inhiber le fonctionnement du T3SS. Ne parvenant pas à obtenir des résultats concrets en travaillant sur l'ATPase, nous avons réorienté légèrement le sujet et nous sommes intéressés à PscL, le partenaire essentiel de PscN.

II PscL

II.1 Purification

Au laboratoire, PscL (24 kDa) est cloné dans le premier site d'un plasmide pEt-Duet n'exprimant que cette protéine (Figure 51). Pour une raison inconnue, PscN dont le gène est cloné dans le deuxième site de ce même plasmide n'est pas du tout exprimé.

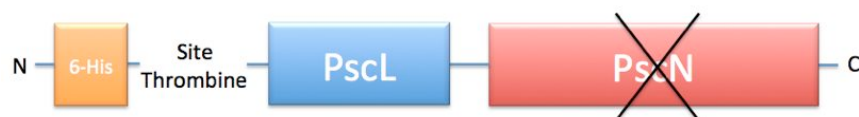


Figure 51:
Schéma de la construction His-PscL : PscN issue du clonage des protéines dans le pEt-Duet.

Pour une raison inconnue, seule PscL est exprimée dans cette configuration.

La protéine PscL est exprimée en grande quantité via cette construction dans des cellules *E.coli* BL21 (DE3) (Figure 52).

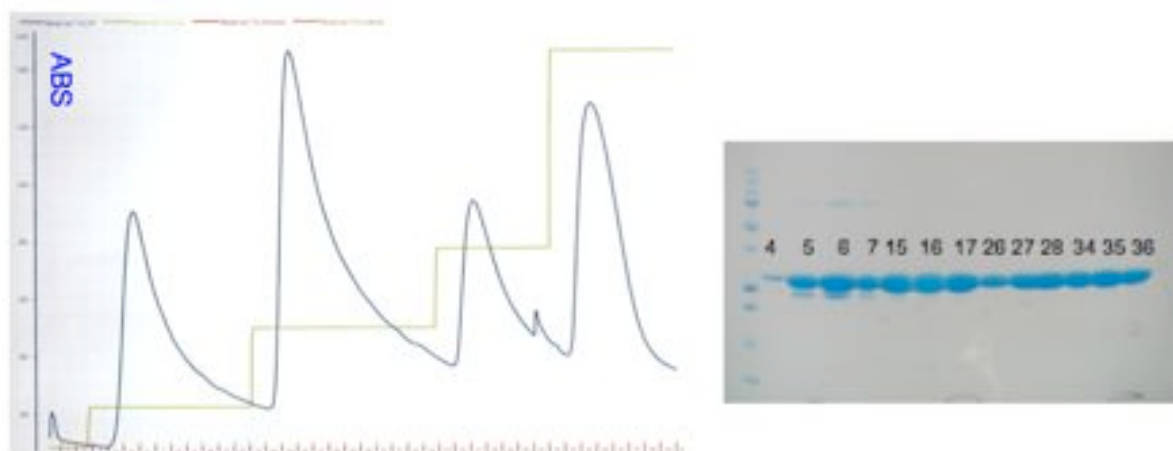


Figure 52 : Purification de PscL par colonne HISTRAP

PscL est produite en grande quantité et est élué pratiquement pure.

Les fractions contenant la protéine d'intérêt sont rassemblées, concentrées et injectées sur colonne de filtration sur gel (Superdex 200) pour contrôler l'homogénéité de l'échantillon (Figure 53).

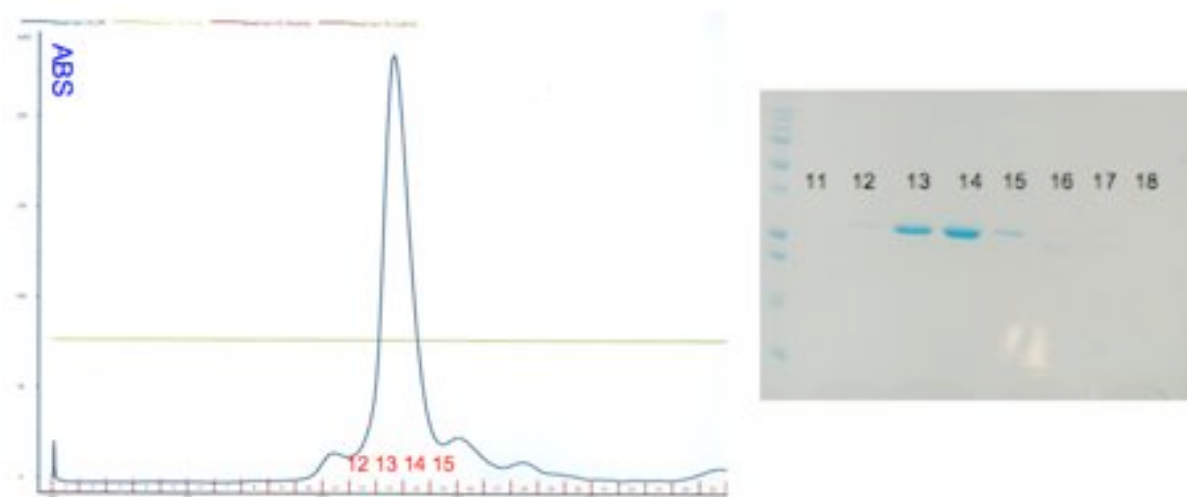


Figure 53 : Purification de PscL par filtration sur gel

La protéine est éluée sous forme très pure dans les fractions 13, 14 et 15
Gauche : profil d'élution de la protéine en filtration sur gel (Superdex SD200)
Droite : Gel SDS-PAGE

Comme on peut le voir sur le chromatogramme d'élution de PscL, la protéine est éluée de façon très homogène (pic fin et très symétrique), avec un poids moléculaire apparent de grande taille. Le volume d'élution de PscL d'après la calibration de la colonne, fait état d'un poids moléculaire apparent de l'ordre de 100 kDa. Le poids d'un monomère de PscL étant de 24 kDa, nous nous sommes intéressés à la multimérisation possible de cette protéine. Comme expliqué précédemment, dans le système flagellaire, FliH est connu sous forme de dimère.

II.2 PscL est un dimère

Dans le but de mieux comprendre le comportement de PscL en solution, nous avons cherché à déterminer l'état d'oligomérisation de cette protéine en solution en utilisant un agent pontant : le Bis-Sulfosuccinimidyl Subérate (BS3).

La fraction la plus concentrée issue de la filtration sur gel est utilisée pour les expériences de pontage chimique (Figure 54).

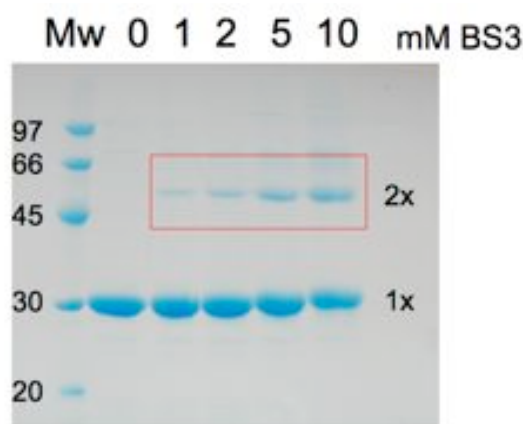


Figure 54 :
Expérience de pontage chimique

PscL est incubé avec une quantité croissante d'agent pontant.
L'apparition d'une bande de plus haut poids moléculaire confirme la dimérisation de PscL en solution.

L'expérience de pontage chimique de PscL révèle l'apparition d'une bande de plus haut poids moléculaire, pouvant être expliquée par la dimérisation de PscL ($2 \times 24 = 48$ kDa). Cette expérience est ainsi une forte indication que PscL dimérise en solution. Cependant, le poids moléculaire d'un dimère, 48 kDa, ne suffit pas à expliquer le profil d'élution de la protéine en filtration sur gel. L'homologie de séquence de PscL avec les protéines formant le stator de l'ATPase F₀-F₁ laisse penser que cette protéine puisse être, comme son homologue, de structure très allongée, ce qui peut expliquer le poids moléculaire apparent élevé du dimère.

II.3 Protéolyse ménagée

Les essais de cristallogénèse de PscL n'ont pas abouti à une piste intéressante. En effet, dans la majorité des essais, la protéine précipite et ne cristallise pas. Des tests de protéolyse limitée ont été menés sur la protéine et un domaine stable a été mis en évidence par la trypsine (Figure 55) :

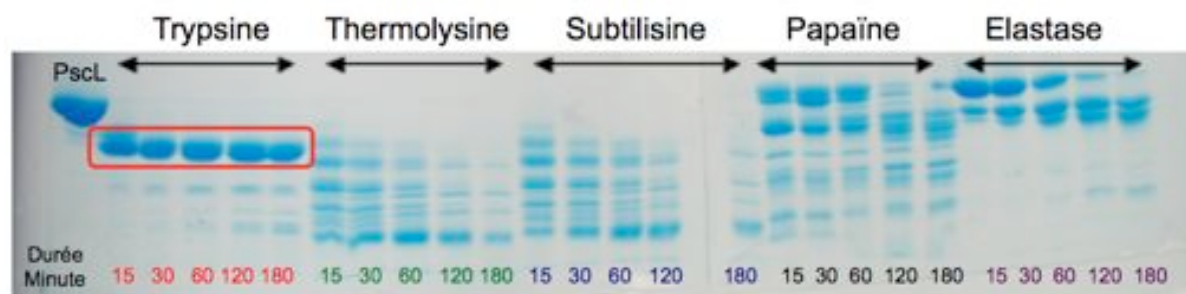


Figure 55: Tests de protéolyse limitée sur PscL

PscL a été incubé différents temps en présence de 5 protéases différentes à un ratio 1:500 (protéase : protéine).

La majorité des protéases dégradent la protéine en de multiples bandes. L'élastase et la trypsine sont les protéases les plus intéressantes. En effet, la trypsine permet de dégrader la totalité de PscL en un fragment plus stable au bout de 30 minutes d'incubation seulement. Ce fragment a été soumis à un séquençage N-terminal et s'est révélé être composé de deux peptides (Figure 56) :

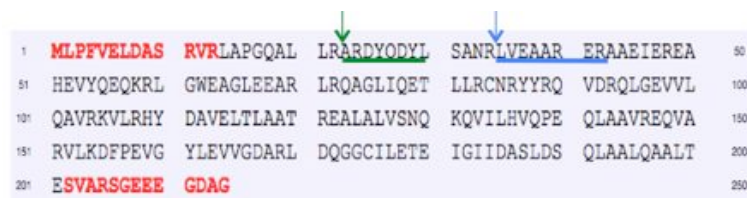


Figure 56: Résultats du séquençage N-terminal de PscL clivé.

En rouge : régions prédites comme étant désordonnées

En vert : première séquence trouvée

En bleu : deuxième séquence trouvée

L'existence de domaines stables isolés par protéolyse limitée est une piste prometteuse pour l'obtention de la structure de cette protéine. Il se peut ainsi que la région qui rend difficile la cristallisation, car flexible, soit dégradée par la protéase. La construction d'un clone plus court commençant donc à l'alanine 23 ou à la leucine 35 pourrait permettre d'obtenir une molécule plus compacte, plus facilement cristallisable. Ces études sont à présent en cours au laboratoire.

Le fait que PscL doive interagir avec PscN nous a laissé penser que former ce complexe permettrait potentiellement de solubiliser PscN. En effet, si PscL se fixe sur une région hydrophobe de PscN, cette région sera alors masquée et la solubilité en sera augmentée. Pour cette raison, nous avons essayé de reconstituer le complexe PscN : PscL.

III Le complexe PscN : PscL

Deux techniques ont été utilisées pour reconstituer le complexe : la co-purification et la co-expression.

III.1 GST-PscN + PscL

Pour réaliser ce complexe, GST-PscN a été exprimé en présence des chaperonnes pour être soluble puis chargé sur colonne GSTrap. Après lavage, un lysat cellulaire contenant PscL a été chargé sur la colonne. Si le complexe est formé, la fraction éluée devrait être composée de GST-PscN et de PscL associé à l'ATPase. La figure 57 montre les résultats obtenus :

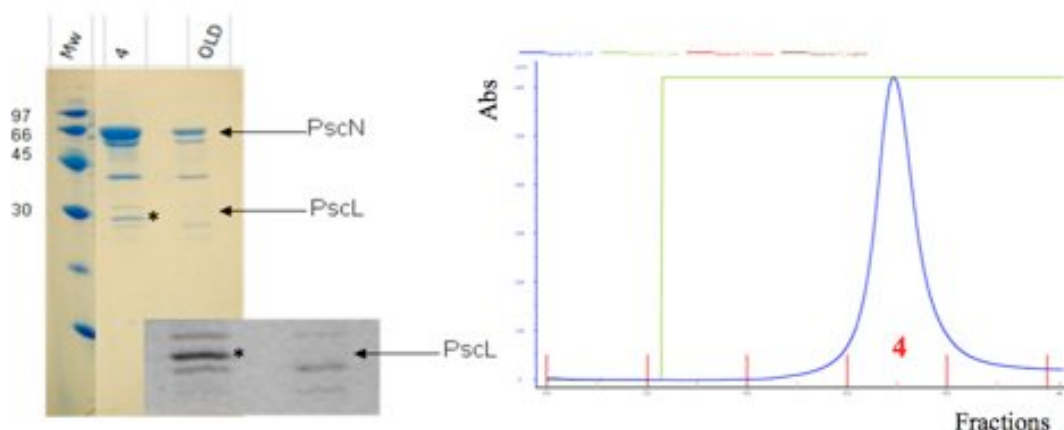


Figure 57: Formation du complexe PscN-PscL par pull-down.

GST-PscN a été chargé sur une colonne GSTrap puis lavé. Un lysat cellulaire contenant PscL a ensuite été chargé sur la colonne pour former le complexe.

MW : Poids moléculaire

4 : Fraction d'élution de la GSTrap (20 mM glutathion réduit)

OLD : Purification de GST-PscN seul comme contrôle.

Comme on peut le voir sur la figure 57, la fraction d'élution 4 présente une bande assez intense correspondant potentiellement à PscL (*), qui n'est pas présente quand PscN est purifiée seule (OLD). Evidemment, la présence de bandes additionnelles correspondant aux chaperonnes contaminant l'échantillon peut être vue dans les deux cas (avec et sans PscL). La quantité de PscL fixé sur PscN peut cependant être discutée. Pour le système homologue du flagelle, il a été montré que FliH (PscL) interagissait avec FliI (PscN) avec une stoechiométrie de 2 FliH pour 1 FliI (Minamino et Macnab, 2000). Bien qu'étant dans un système différent et que donc, la stoechiométrie du complexe puisse varier, il semblerait ici que PscL ne puisse pas correctement interagir avec l'ATPase. Ce problème est potentiellement dû au fait que les chaperonnes masquent le site d'interaction des deux protéines. Pour palier à ce problème, et forts de ce résultat encourageant, nous avons décidé de créer un nouveau plasmide à partir duquel nous pourrions exprimer le complexe dans la même cellule. Ainsi PscL pourra se fixer sur PscN et potentiellement former un complexe soluble.

III.1.1 pEt-Duet : His-PscN : PscL

La construction choisie pour la co-expression résulte du clonage de PscN dans le premier site de clonage du pEt-Duet et de PscL (24 kDa) dans le second (Figure 58) :

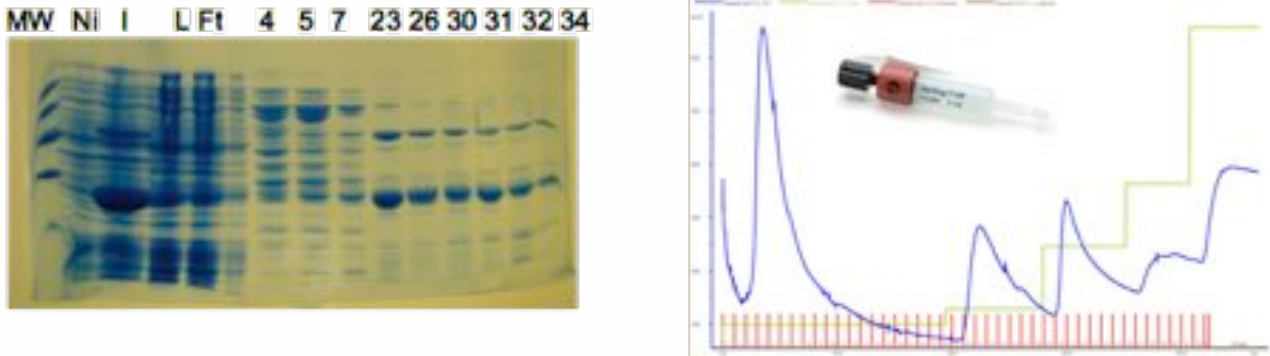
Figure 59: Formation du complexe PscN-PscL par co-expression et co-purification sur colonne Hisrap pour les protéines dans le pEt-Duet. *P. aeruginosa* **Figure 60:** Schéma de la construction His-PscN:PscL issu du clonage des gènes codant pour les protéines dans le pEt-Duet. **Résultats**

MW : Poids moléculaire
Ni : Non induit I : Induit L : lysat soluble FT : Non retenu



Ce plasmide a été utilisé pour transformer des bactéries *E. coli* BL21 (DE3) classiques à partir desquelles des tests d’expression ont été réalisés. Ces tests ont abouti à un protocole d’expression identique à celui utilisé pour GST-PscN.

Après 4 litres de culture, le lysat soluble est chargé sur colonne (Hisrap 1 ml) et les protéines sont éluées (Figure 59) :



Le gel SDS-PAGE de la figure ci dessus, confirme l’interaction entre les deux protéines PscN et PscL. Le complexe est cependant mieux formé dans le cas de la co-expression des deux protéines.

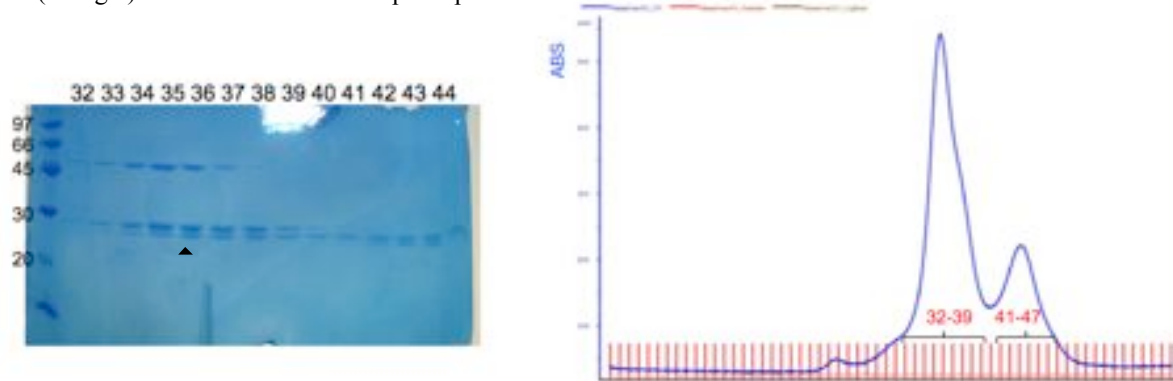
Les fractions contenant le complexe PscN : PscL sont rassemblées, concentrées et injectées sur une colonne de filtration sur gel (Superdex 200). Le profil d’élution obtenu atteste de la stabilité et de la solubilité du complexe (Figure 60) :

Figure 60: Purification du complexe PscN : PscL par filtration sur gel
P. aeruginosa

Résultats

Le complexe PscN : PscL (étoiles) est élué entre les fractions 32 et 39 ce qui atteste de sa solubilité et sa stabilité.

Le contaminant (triangle) en dessous de PscL est principalement élué entre les fractions 41 et 47



Le complexe PscN : PscL est élué dans le premier « pic », dans les fractions comprises entre 32 et 39. Le contaminant en dessous de la bande de PscL, identifié par séquençage N-terminal comme étant une chaperonne de *E. coli*, est élué dans les fractions 41 à 47.

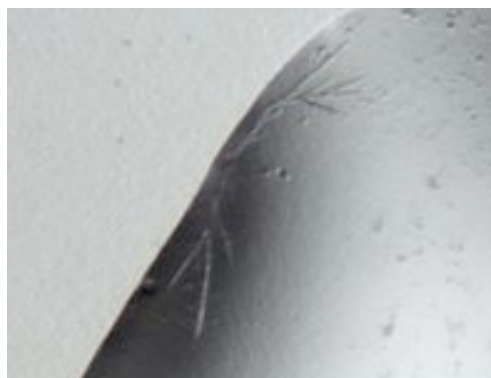
Bien que la cristallogénèse des protéines requière un échantillon d'une très grande pureté, les fractions 32 à 38 sont rassemblées puis concentrées jusqu'à 5,5 mg/ml (valeur au delà de laquelle le complexe a tendance à précipiter).

III.2 Cristallogénèse du complexe PscN : PscL

L'échantillon a été testé au robot de cristallisation haut débit du PSB (Partnership for Structural Biology) (HTXLab). Les tests se font sur des plaques 96 puis selon la technique de la goutte assise (variation de la technique de la goutte suspendue). Six plaques, soit 576 conditions ont été testées.

Au bout d'un mois, un cristal sous forme de fines aiguilles est apparu dans la condition 89 du kit « The Classics » de chez Qiagen (Figure 61). Les cristaux ont été obtenus à 4°C dans 0,2 M de sulfate de lithium, 0,1 M de Tris-HCl pH 8,5 et 30% de PEG 4000. Ceci représente une piste très prometteuse en vue de l'obtention de la structure complète de l'ATPase du T3SS de chez *P. aeruginosa* en complexe avec une protéine partenaire majeure. L'affinement de cette condition est à présent en cours au laboratoire. Pour cela, nous testons la cristallisation du complexe à différentes températures, dans différents tampons et avec différents additifs.

[PscN : PscL] = 5,5 mg/ml



IV Discussion

Les expériences menées sur l'ATPase seule n'ont pas abouti aux résultats attendus. En effet, PscN est une protéine très hydrophobe et très instable lorsqu'elle est exprimée sans ses partenaires.

La protéine PscL, partenaire de l'ATPase, est très fortement sur-exprimée par la machinerie d' *E. coli*. La purification permet ainsi d'obtenir un taux de rendement élevé mais malgré ces résultats encourageants, aucun cristal n'a pu être obtenu. En effet, la protéine est peu stable en solution et possède une forte tendance à précipiter lorsqu'elle est concentrée (au delà d'1 mg/ml). Pour palier à ce problème, un domaine plus court, probablement plus stable a été isolé par protéolyse limitée. Le clonage de ce domaine dans un plasmide d'expression pourrait permettre la production de celui-ci en grande quantité et mener à la résolution de la structure de PscL. Tout comme FliH, nous avons montré que PscL est capable de dimériser et cette caractéristique est un argument supplémentaire suggérant que les protéines de cette famille puissent être homologues au stator de l'ATP synthase, (Lokanath *et al.*, 2006).

Notre étude du complexe ATPase-PscL semble très prometteuse.

Le complexe PscN : PscL a été sur-exprimé sous forme soluble pour la première fois. Bien que peu stable dans le temps, ce complexe a pu être testé en cristallogénèse et a dorénavant déjà donné une piste très prometteuse. La poursuite des tests de cristallisation du complexe et la reproduction des cristaux obtenus avec le robot du PSB sont une priorité pour la poursuite de cette étude, mais les cristaux alors obtenus semblent très peu reproductibles. De nombreux groupes travaillent sur l'ATPase du T3SS et ne parviennent pas à obtenir de complexe comme celui obtenu au cours de cette étude. La stoechiométrie du complexe et bien évidemment sa

structure seront des éléments très importants dans la compréhension de la biogenèse du T3SS chez *P. aeruginosa*.

V ExsB

Du fait du manque de résultats publiables sur ce projet, j'ai émis le souhait auprès de ma directrice de thèse, de travailler parallèlement à l'ATPase sur une autre protéine du système de sécrétion de type III. Viviana Job, chercheur dans notre groupe travaillait à ce moment là sur la sécrétine PscC du système. C'est alors qu'est venue l'idée de caractériser ExsB, la pilotine potentielle du T3SS chez *P. aeruginosa*. Comme décrit dans la partie introduction, très peu de choses étaient connues sur cette protéine. En 1995, le groupe de Cornelis présente ExsB comme un homologue potentiel de VirG (YscW), la pilotine chez *Yersinia* spp. (Allaoui *et al.*, 1995). Deux ans après, suite à un travail sur la régulation de l' 'expression de la toxine ExoS, Goranson et ses collègues ont conclu que ExsB n'était pas exprimée chez *P. aeruginosa*. Cet article a conduit à l'abandon des recherches sur ExsB puisque depuis, aucun nouvel article ne parlait de cette protéine.

Nous avons cependant sur-exprimé ExsB dans *E. coli* et produit des anticorps contre cette protéine qui ont prouvé que ExsB était bien exprimée dans *P. aeruginosa*. De plus, nous avons mené des expériences de localisation cellulaire montrant que ExsB était localisé dans la membrane externe et résolu sa structure par cristallographie aux rayons X.

Résumé de l'article :

Pseudomonas aeruginosa emploie un système de sécrétion de type III pour injecter des toxines directement dans le cytoplasme des cellules-hôte. ExsB est une protéine de 15,6 kDa qui partage une forte homologie de séquence avec YscW, une lipoprotéine de *Yersinia spp.* impliquée dans la stabilisation des oligomères de sécrétine YscC. Dans cet article, nous montrons pour la première fois que ExsB est exprimée chez *P. aeruginosa* au moment de l'induction de la synthèse des protéines du T3SS et que cette protéine est associée à la membrane externe. De plus, nous avons résolu la structure de ExsB par cristallographie aux rayons X. ExsB possède un repliement en forme de bêta-sandwich unique et arbore une large région basique qui pourrait jouer le rôle d'ancrage membranaire. La structure de ExsB ainsi que celle du modèle de YscW que nous avons générée est très distincte de celle de MxiM, une lipoprotéine impliquée dans la stabilisation de la sécrétine chez *S. flexneri* et des lipoprotéines Pil impliquées dans la formation de l'anneau externe des pili. Nos résultats montrent, entre autre, que les lipoprotéines « pilotines » ne sont pas structurellement conservées d'un système à l'autre comme il a pu être suggéré dans le passé.

**Structural characterization and membrane localization of ExsB from the
type III secretion system (T3SS) of *Pseudomonas aeruginosa***

Thierry Izoré^{1,3,4}, Caroline Perdu^{2,3,4,5}, Viviana Job^{1,3,4}, Ina Atree^{2,3,4,5},
Eric Faudry^{2,3,4,5}, and Andréa Dessen^{1,2,3,6}

¹ Bacterial Pathogenesis Group, Institut de Biologie Structurale (IBS), Université
Grenoble I;

² Bacterial Pathogenesis and Cellular Responses Group, iRTSV, Université Grenoble I;

³ Commissariat à l'Energie Atomique (CEA), IBS and iRTSV;

⁴ Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), IBS and ERL5261;

⁵ INSERM U1036_S, Grenoble, France

⁶ to whom correspondence should be addressed:

andrea.dessen@ibs.fr tel: (33)4-38-78-95-90

fax: (33)4-38-78-54-94

ABSTRACT

Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic human pathogen that employs a finely tuned type III secretion system (T3SS) to inject toxins directly into the cytoplasm of target cells. ExsB is a 15.6 kDa protein encoded in a T3SS transcription regulation operon that displays high sequence similarity to YscW, a lipoprotein from *Yersinia* spp. whose genetic neighbourhood also involves a transcriptional regulator, and has been shown to play a role in the stabilization of the outer membrane ring of the T3SS. Here, we show that ExsB is expressed in *P. aeruginosa* upon induction of the T3SS, and subcellular fractionation studies reveal that it is associated with the outer membrane. The high-resolution crystal structure of ExsB shows that it displays a compact β -sandwich fold with interdependent β -sheets. ExsB possesses a large patch of basic residues that could play a role in membrane recognition, and carries a fold which is distinct from those of MxiM, a lipoprotein involved in secretin stabilization in *Shigella*, as well as Pil lipoproteins involved in pilus biogenesis. These results reveal that small lipoproteins involved in formation of the outer membrane ring display clear structural differences that may be related to the different functions they play in these systems.

INTRODUCTION

Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic pathogen, the causative agent of a high number of nosocomial infections, and a particular threat for cystic fibrosis patients, whose lungs it colonizes upon formation of a biofilm. In addition, *P. aeruginosa* is highly resistant to antibiotic treatment due to the action of efflux pumps, as well as of resistance plasmids carried naturally¹. Much like several other Gram-negative bacteria, it uses a type III secretion system (T3SS), a needle-like apparatus composed of more than 20 proteins whose function is to inject toxins directly into the cytoplasm of target cells (Fig. 1a)²⁻⁶. Toxin effects include cytoskeletal disruption, permeabilization of the host cell membrane, and oncosis⁷⁻⁹.

Over the last few years, considerable efforts have been made to structurally and functionally characterize the components of the T3SS in order to further the understanding of its biogenesis, assembly, and toxin secretion processes^{4,10,11}. One main interest has been the characterization of the basal body, which is composed of two membrane-imbedded rings that span both bacterial bilayers. Notably, the outer membrane ring (OMR) is formed by the secretin (PscC in Fig. 1a), an oligomeric protein harboring between 12 to 14 subunits that generates a central pore big enough to allow the passage of partially folded proteins¹²⁻¹⁵. Secretins often require accessory lipoproteins (some of which are termed ‘pilotins’) that allow their outer membrane localization and promote the stability of their oligomeric form, as is the case for InvH from the T3SS of *Salmonella enterica*, which is required for the proper localization of the secretin InvG¹⁶⁻¹⁹. Such associations have also been described in type IV pili²⁰⁻²² and T2SS, the latter of which includes the well studied PulS pilotin from *Klebsiella oxytoca*, which promotes localization and stability of the secretin PulD²³⁻²⁵. MxiM from *Shigella flexneri*, which stabilizes the T3SS secretin MxiD, has been structurally and biochemically characterized²⁶⁻²⁸, but its classification as a *bona fide* pilotin is still a matter of

controversy due to the involvement of an inner membrane lipoprotein (MxiJ) in MxiD stabilization²⁹. It is of note that although pilot proteins from different systems display low sequence identities, they have been described as sharing key features such as low molecular weight, high pI, and a lipidation/maturation site at their N-terminus characterized by a specific consensus motif (the lipobox; (V/L)XXC;³⁰). Interestingly, systems that lack these dedicated lipoproteins can possess secretins that carry a lipidated N-terminus, which is the case of HxcQ, a key component of the T2SS of *P. aeruginosa*, which promotes its self-piloting to the outer membrane³¹.

The T3SS of *Yersinia spp*, requires the outer membrane lipoprotein YscW to promote OM targeting and oligomerization of the secretin YscC. The absence of YscW reduces the oligomerization level of YscC, and in conditions of YscC overexpression, its outer membrane targeting is impaired. Interestingly, a non-lipidated form of YscW is non-functional, being unstable and potentially unable to correctly localize overexpressed YscC; these results suggest that YscW plays the role of pilotin for YscC¹⁶. Notably, YscW shares approximately 60% sequence similarity (26% identity) with ExsB, which is encoded by the *P. aeruginosa* regulatory operon *exsCEBA* (Fig. 1b), and Psc and Ysc T3SS form a closely related gene clade³². ExsB was predicted to be a 15.6 kDa, 141 amino acid protein with a pI of 9.43 carrying a classic LXGC lipidation site and a type II signal peptide³³ within residues 1 to 16 (Fig. 1d), much like YscW. These observations initially suggested that ExsB could be the functional homolog of YscW in the *Pseudomonas* T3SS system^{16,34}. Interestingly, an even greater similarity (73%; sequence identity 56%) was identified between ExsA and VirF, proteins encoded by genes immediately downstream from *exsB* and *yscW* in *Pseudomonas* (Fig. 1b) and *Yersinia*, respectively; their carboxy termini are almost identical³⁴. ExsA and VirF are members of the AraC/XylS family of transcriptional regulators, and are involved in the protein interaction cascade that couples secretion activity and transcriptional activation in

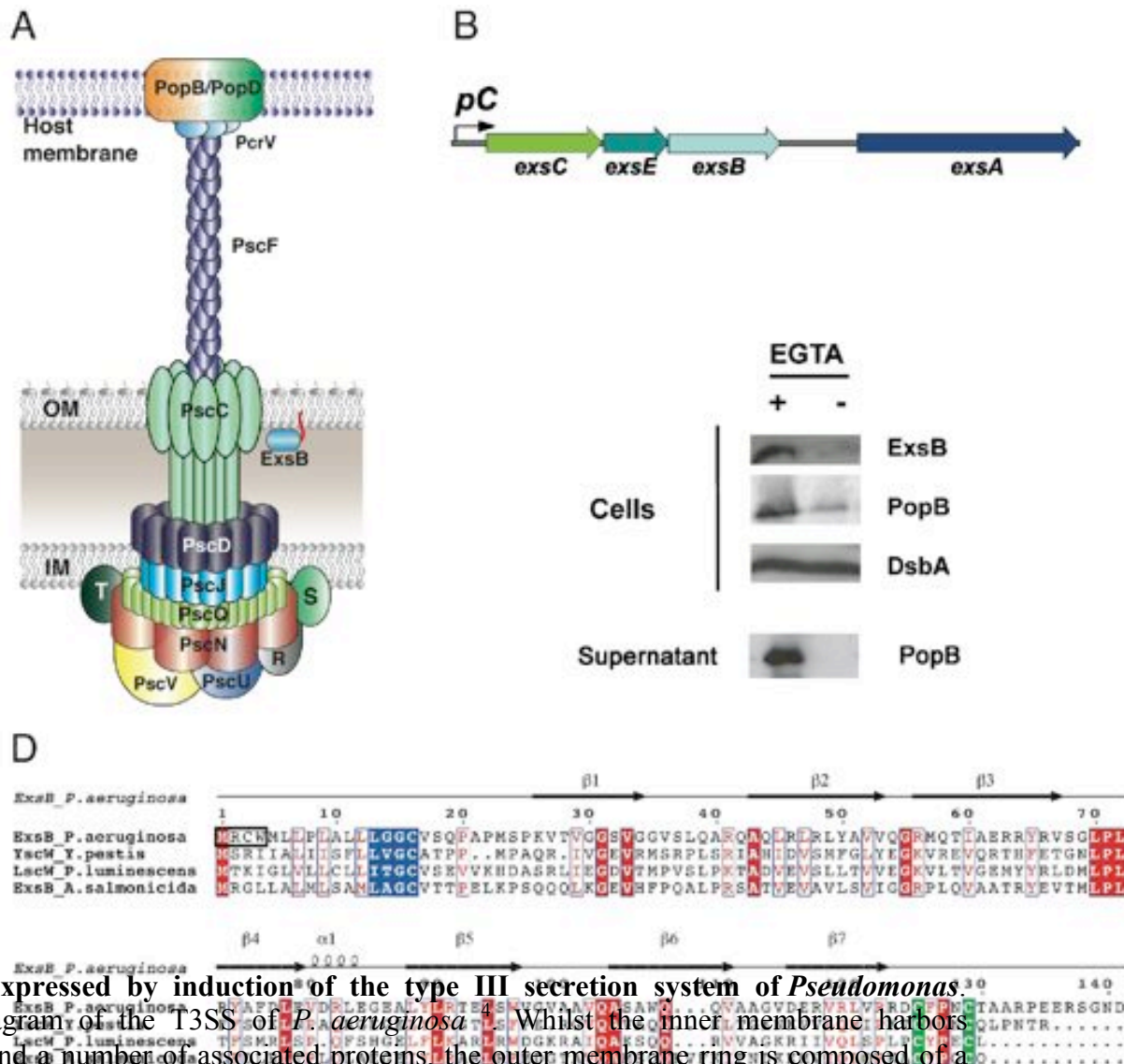
the T3SS of *Pseudomonas* and *Yersinia* ^{35,36}. These observations suggest that there may be a number of functional/regulatory similarities within these systems in both pathogens.

The potential role played by ExsB in T3SS functionality, however, has been controversial, since *exsB* was originally reported as being a non-translated gene in *P. aeruginosa* ³⁷. In order to clarify this point and explore the biological function of ExsB, we investigated and validated its synthesis in *P. aeruginosa* in T3SS-inducing conditions, determined its subcellular localization, and solved its high-resolution crystal structure. ExsB is an outer membrane protein that displays a novel fold that is distinct from those of other secretion or pilus-related lipoproteins that have been previously structurally characterized. ExsB folds into a β -sandwich and displays a highly charged region that could potentially be involved in outer membrane recognition or binding of partner proteins. These results shed light on the function of ExsB/YscW in secretion systems and reveal that structural characteristics of other lipoproteins involved in assembly of outer membrane complexes are likely to be system-dependent.

RESULTS AND DISCUSSION

ExsB is expressed in *P. aeruginosa* and fractionates to the outer membrane

ExsB is encoded in a locus that controls the synthesis of the ExoS toxin (Fig. 1b), and initial attempts by Goranson and co-workers to detect its expression in *P. aeruginosa* were unsuccessful³⁷. Here, employment of an upstream GTG start codon, leading to the addition of four residues at the N-terminus of the predicted ExsB sequence (Met-Arg-Cys-Trp, Fig. 1d), yielded an ExsB form that was clearly expressed in *E. coli*, which allowed us to purify the protein and generate specific antibodies directed towards ExsB. In order to confirm the expression of ExsB in *P. aeruginosa*, we prepared whole cell extracts and blotted protein content with anti-ExsB antibodies. ExsB was clearly detected in *P. aeruginosa* cell extracts (Fig. 1c) and migrates with an approximate molecular mass of 15 kDa, as predicted from the sequence (Fig. 1d). Induction of protein expression was detected both for ExsB and for T3SS translocator PopB, used here as a positive control, when cultures were grown in Ca²⁺ depletion conditions (+EGTA), known to induce T3SS operons *in vitro*³⁸. The N-terminal sequence of ExsB displays one charged amino acid followed by a stretch of hydrophobic/uncharged residues, which is the characteristic signature of a signal peptide. This sequence is followed by the LXGC motif (blue box in Fig. 1d), indicative of a lipoprotein-processing site, suggesting that ExsB could be associated with the membrane through its lipid recognition sequence. In order to identify the cellular localization of ExsB, inner and outer membranes of a highly cytotoxic *P. aeruginosa* strain (CHA, originally isolated from a cystic fibrosis patient) were separated by sucrose density gradient centrifugation after induction of the T3SS by Ca²⁺ depletion.



1. ExsB is expressed by induction of the type III secretion system of *Pseudomonas*. Schematic diagram of the T3SS of *P. aeruginosa*.⁴ Whilst the inner membrane harbors two rings and a number of associated proteins, the outer membrane ring is composed of a oligomeric protein, the secretin.

The *exsCEBA* operon is comprised of four genes under the control of the *pC* promoter. Of note, beginning of the *exsB* gene overlaps with the end of the *exsE* upstream gene.

ExsB is expressed in *P. aeruginosa*. Bacteria were grown in T3SS non-inducing (EGTA-) or inducing (EGTA+) conditions. Cells and supernatants were analysed for the presence of ExsB, (a T3SS translocator protein) and DsbA (loading control). As expected, under conditions of induction, PopB is secreted (bottom) and its cytoplasmic pool is increased. An increase in production is also observed under calcium depletion conditions.

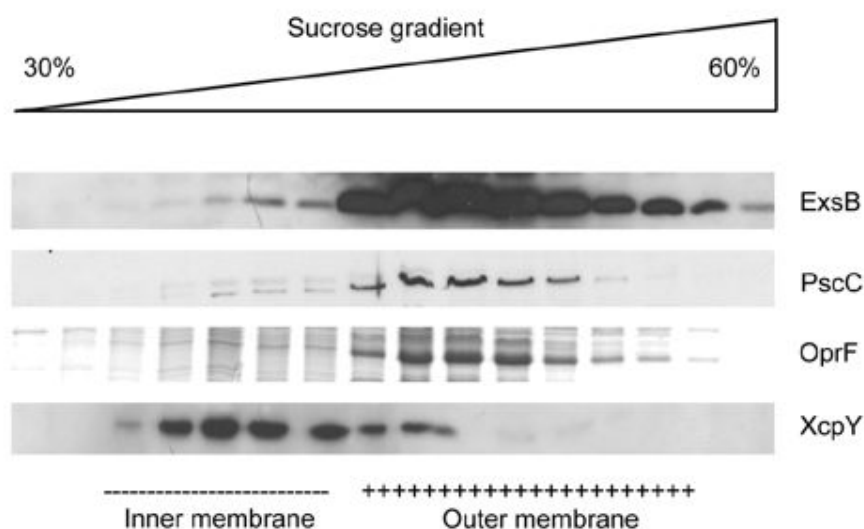
sequence alignment of ExsB homologs in *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia pestis*, *rhabdus luminescens* and *Aeromonas salmonicida*. Identical residues are shown with a red round, whereas similar residues are shown in red and highlighted with blue boxes. Conserved residues are highlighted in green, whereas the lipobox residues are shown with a blue background. A black rectangle encompasses the 4 additional residues in *P. aeruginosa* which should now be included as part of the full-length sequence, and include the ‘new’ start codon. Secondary structure elements visualized in the ExsB structure are indicated above the sequences.

Fig. 2. ExsB and PscC localize to the outer membrane.

Membranes of the clinical *P. aeruginosa* CHA strain were separated on a sucrose gradient and protein content was analyzed by Western blot with antibodies directed against ExsB and PscC. The major porin OprF (visualized by Coomassie staining) and XcpY (Western blot) were used to identify outer and inner membranes, respectively. Note that ExsB co-localizes with the secretin PscC by Western blotting. Inner and outer membranes were identified through the

presence of XcpY and OprF, selective markers for inner and outer membranes, respectively.

ExsB was found to be co-localized with the secretin PscC to the outer membrane (Fig. 2), much like its *Yersinia* counterpart, YscW, which co-localizes with secretin YscC¹⁶.



The structure of ExsB reveals a novel fold

In order to gain further insight into ExsB functionality, we crystallized it and solved its high-resolution structure. In order to obtain soluble, crystallizable protein, we employed a construct lacking the signal peptide and the lipidation sequence. Our construct harbored two tags, namely a hexa-histidine tag followed by a maltose-binding protein (MBP) located N-terminally to ExsB (17-141) and intercalated by a thrombin cleavage site (Fig. 3a). This construct was expressed in the *E. coli* periplasm and purified by Ni-chelating and cation

exchange (Mono S) chromatographies; tags were removed by thrombin cleavage prior to crystallization. Gel filtration experiments performed on a Superdex 200 column revealed that ExsB eluted as a monomer (not shown). ExsB (17-141) crystallized in space group C2 with three molecules in the asymmetric unit, and the structure was solved by performing a single anomalous dispersion (SAD) experiment on a selenomethionylated crystal at the ESRF synchrotron in Grenoble. This initial experiment generated a 3 Å model, which was subsequently used to phase native data collected to 1.8 Å. Data collection, phasing and refinement statistics are included in Table I, below.

Data Collection, Phasing, Molecular Replacement, and Structure Refinement Statistics

Data Collection		
Data set	Peak	Native
Wavelength (Å)	0.9792	0.9334
Space group	C2	C2
a (Å)	125.6	124.2
b (Å)	48.8	48.4
c (Å)	72.5	71.6
$\alpha = \beta$ (°)	90.0	90.0
γ (°)	96.6	96.9
Resolution (Å)	3.0	1.8
No. Observed/unique reflections	94,664/16,999	110,486/35,870
Completeness (%)	98.9 (94.2)	89.9 (75.6)
Rsym (last shell)	14.6 (37.8)	3.8 (39.5)
I/ σ (I) (last shell)	12.3 (5.1)	28.9 (3.0)
Phasing		
Phenix FOM (obs)	0.28	
Molecular Replacement		
Phaser RFZ/TFZ		22.2/31.2
Phaser LLG		289/290
Refinement		
Resolution (Å) (outer resolution shell)		1.81 (1.857)
Rwork (%)		21.6 (40.6)
Rfree (%)		25.9 (43.4)
No. of protein atoms		2714
No. of solvent atoms		155
No. of nickel ions		1
No. of sulfate ions		4
Rmsd, bond lengths (Å)		0.015
Rmsd, bond angles (°)		1.786
Mean B factor (Å ²)		31.2
Residues in most favored/allowed regions of Ramachandran plot (%)		100

The structure of ExsB is composed of 7 β -strands and an α -helical turn (Fig. 3b) and folds into a curved β -sandwich. The 3 smaller strands (β 1, β 4 and β 7) are packed against the 4 longer curved strands (β 2, β 3, β 5 and β 6) forming a 40 x 20 Å structure. The region between the two β -sheets is decorated with side chains from both sheets, forming a tightly packed arrangement. Although the detergent dodecyl maltoside (DDM) was employed in the purification and was present as an additive in the final buffer at a concentration of 1 mM, it could not be visualized in the electron density map. Analysis of the structure of ExsB by the DALI server (http://echidna.biocenter.helsinki.fi/dali_server/) identified strong structural similarities with specific domains of β -galactosidases; the significance of this similarity is unclear.

The structure also revealed the formation of a disulfide bridge between the well-conserved C-terminal cysteines (Cys125 and 129) (Figs. 1d, 3b, 3c). The role of this disulfide bond is unclear, since a stabilizing effect may be excluded due to the proximity of the two residues involved. Although their conservation in ExsB-like molecules from all Ysc-T3SS-related organisms (Fig. 1d) suggests that they could play a common role in a number of different species, *Yersinia* strains carrying YscW with the two C-terminal Cys residues mutated into serines did not display any T3SS-related phenotype³⁴.

Two features of the ExsB structure of particular interest. The first one is a positively charged residue patch, on the surface of the curved β -sheet, composed of four arginines that point out into the solvent (Arg46, Arg48, Arg64 and Arg91; Fig 4a). This basic region could potentially mediate the interaction between ExsB and acidic lipids in the outer membrane, as it has been reported for other membrane-recognizing proteins such as Src, a tyrosine kinase implicated in signal transduction which employs a cluster of basic residues to enhance its recognition of lipid head groups on the plasma membrane³⁹ and HIV phosphoprotein Nef, which is essential for the modulation of signal transduction pathways upon HIV infection and

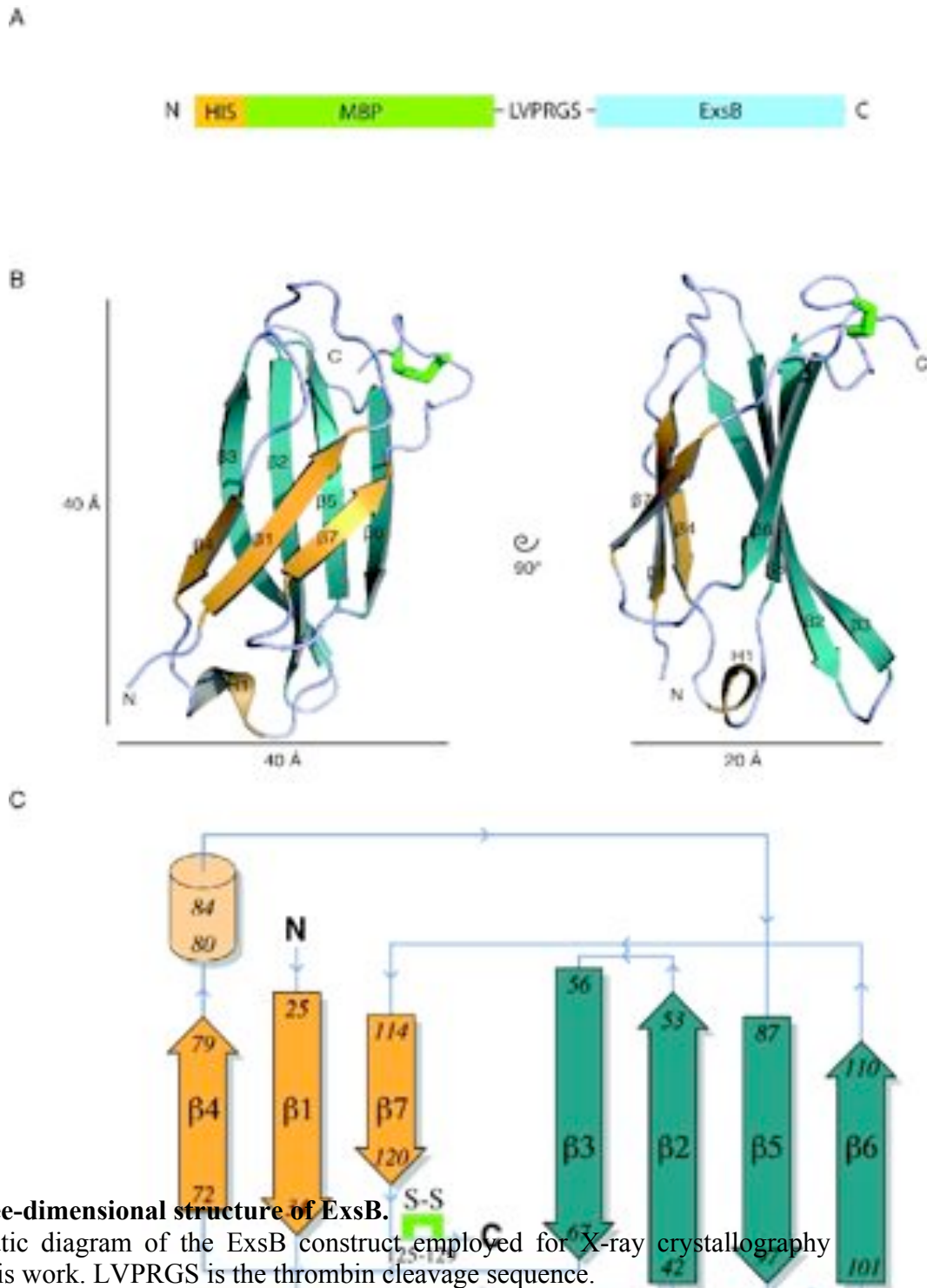


Fig. 3. Three-dimensional structure of ExsB.

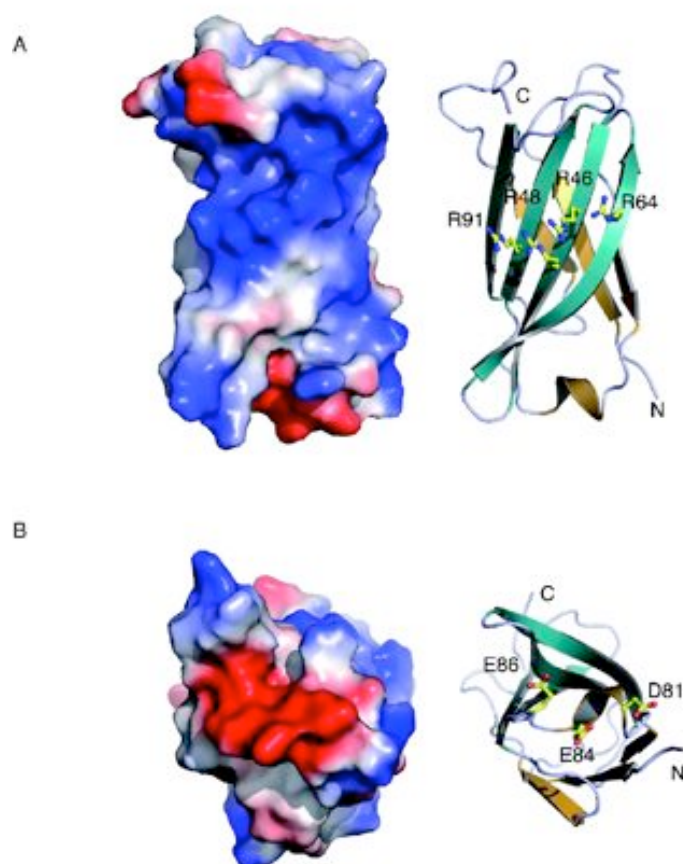
(A) Schematic diagram of the ExsB construct employed for X-ray crystallography studies in this work. LVPRGS is the thrombin cleavage sequence.

(B) ExsB folds into a β -sandwich with a short α -helix. The disulfide bridge is shown in light green.

(C) The topology diagram of ExsB reveals that the β -sheets are interdependent (i.e., strands do not form independent sheets, but are woven between both sheets). β -strands forming the two β -sheets are shown in yellow and in green. The disulfide bridge is shown in light green.

P. aeruginosa
Fig. 4 Key charged regions in ExsB.

whose membrane-recognition basic cluster is located at its N-terminus⁴⁰. It is of interest that (A) ExsB displays a highly basic region (represented in blue in the structure). This region is rich in arginine residues (Arg46, Arg48, Arg64 and Arg91). (B) View from the bottom of ExsB (secondary structure A), showing the acidic region of ExsB: Asp81, Glu84 and Glu86 generate the negative charge of this region. cradle-shaped area identified with SURFNET, a program employed to generate molecular surfaces and predict potential protein binding sites⁴¹. The cradle identified in this manner is in fact an elongated region of 1100 Å³ that harbors a number of hydrophobic residues within the trough and is a potential binding site for other T3SS partner proteins.



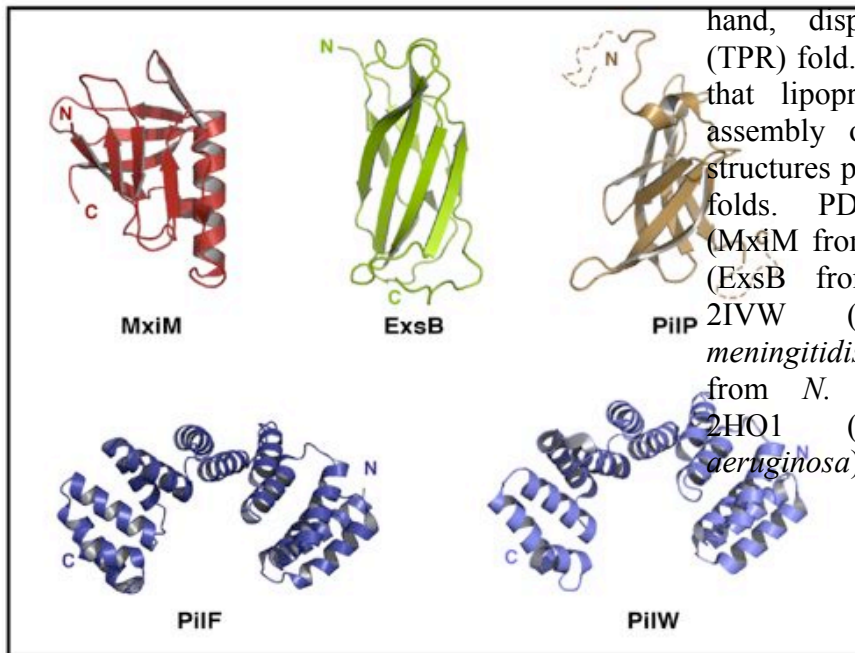
Notably, the structure of ExsB is distinct from that of MxiM (Fig. 5), a key lipoprotein of the *Shigella* T3SS which has been shown to interact with the secretin MxiD²⁸. Although both structures display stacked antiparallel β -sheets, ExsB lacks the elongated α -helix present in MxiM, as well as the linear hydrophobic tunnel at its core, shown to bind lipids²⁶. In addition, ExsB displays no structure similarity to any of the outer membrane-associated lipoproteins involved in either assembly of secretion systems or pilus macromolecular machineries whose 3D structures have been solved (Fig. 5). Although most of them have been implicated to different extents in assembly of the secretin, the main component of the OMR, it is of note that all of the structures show clear differences. In addition to being distinct from MxiM, the structure of ExsB is also different from that of PilP and PilW, both of which are involved in assembly of the PilQ secretin of the type IV pilus of *Neisseria meningitidis*, and PilF, which participates in the analogous process in *Pseudomonas*. The NMR structure of PilP displays a small β -stranded core and was found to resemble streptavidin⁴². PilW, on the other hand, in whose absence PilQ remains monomeric⁴³, folds as a disulfide bridged tetratricopeptide (TPR) protein⁴⁴, much like PilF^{22,45}. Thus, even amongst proteins that have been clearly linked to assembly of outer membrane elements, structural differences do not allow for the generalization of their functions. These observations underline the importance of determining the role of each one of these proteins in secretion/pilus formation, as well as details of their interactions with their cognate protein partners, prior to generalization regarding their mechanisms of action²⁹.

The localization of ExsB within an operon involved in transcriptional regulation is also of interest. The gene coding for ExsB is located immediately upstream of ExsA, an AraC/XylS-type regulator. Transcriptional activation and secretion are linked through a

Fig. 5 Gallery of lipoproteins

protein interaction cascade that involves not only ExsE and ExsC, but also ExsD, which antagonizes the activity of ExsA by directly binding to it, forming a 1:1 complex that cannot

and pilotins. ExsB, MxiM and PilP display β -sandwich folds, with that of MxiM resembling the structure of lipocalins²⁶. PilW and PilF, on the other hand, display an all-helical (TPR) fold. This gallery reveals that lipoproteins involved in assembly of outer membrane structures possess very different folds. PDB codes : 1Y9L (MxiM from *S. flexneri*), 2YJL (ExsB from *P. aeruginosa*), 2IVW (PilP from *N. meningitidis*), 2VQ2 (PilW from *N. meningitidis*), and 2HO1 (PilF from *P. aeruginosa*)



bind DNA^{36,38}. Despite its genetic localization, ExsB is yet to be shown to be involved in any type of transcriptional regulation loop, much like its *Yersinia* counterpart, YscW, whose gene is also located immediately upstream from a transcriptional regulator of the AraC/XylS family. Interestingly, a *P. aeruginosa* strain deleted of *exsB* displayed severely reduced production of the T3SS toxin ExoS, suggesting that it plays an important role in T3SS functionality³⁷. It is thus conceivable that these proteins may display distinct mechanisms of action that are nonetheless crucial for the optimal functioning of a finely tuned type III secretion system.

MATERIALS AND METHODS

Protein expression in *Pseudomonas aeruginosa*

Clinical isolate CHA, a *P. aeruginosa* strain originally isolated from a cystic fibrosis patient ⁴⁶, was used for all experiments and was grown in LB medium at 37°C with agitation at 300 rpm. The T3SS was induced by calcium depletion with 5 mM EGTA and 20 mM MgCl₂. 5 mM CaCl₂ was added in non-induced cultures in order to prevent basal T3SS protein expression. At an optical density (OD₆₀₀) of 1, the cells were pelleted by centrifugation at 5,000g and 4°C. For Western blotting, the supernatants were mixed with sample buffer and, for total cell protein analysis, cells were concentrated twice and subsequently boiled for 10 minutes in sample buffer.

Membrane separation by sucrose gradient centrifugation

Inner and outer membranes were separated by centrifugation on sucrose gradients. Cell pellets from a 500 mL T3SS-induced *P. aeruginosa* culture were resuspended in 25 mL of buffer (20% sucrose (w/w) in 10mM Tris-HCl at pH 7.4, 1 mM PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride), 10 µg/mL RNase, 10 µg/mL DNase). After cell lysis with a M-110P Microfluidizer at 15000 p.s.i. for 5 min, unbroken cells were removed by centrifugation and total membranes were isolated by ultracentrifugation at 138,000g for 45 min. Inner and outer membranes were separated by a sucrose gradient as described by Viarre and co-workers ³¹. Briefly, total membranes were resuspended in a buffer containing 20% sucrose (w/w), 8 mM Tris-HCl at pH 7.4, 4 mM EDTA and protease inhibitor cocktail complete (Roche) and loaded at the top of a 30-60% sucrose gradient in the same buffer. After 72 hours of ultracentrifugation at 190,000g, 24 fractions of 500µL were collected and analyzed by SDS-PAGE and Western blotting.

Electrophoresis and Western blotting

Samples were analyzed by SDS-PAGE on 15% polyacrylamide gels. Proteins were stained with either Coomassie blue or analyzed by Western blots. For the latter experiments, proteins were transferred onto nitrocellulose membranes; after incubation with primary antibodies raised against ExsB (obtained from mice injected with the purified protein employed for X-ray crystallography; Agro-Bio), PopB⁴⁷ or XcpY, secondary HRP-associated antibodies were added. Proteins were detected with a chemiluminescence kit (GE Healthcare).

Expression and purification of recombinant proteins

The region of the *P. aeruginosa* *exsB* gene coding for amino acids 17 to 141 was amplified using conventional PCR methodologies and cloned into a modified pMalE vector⁴⁴. The resulting vector was transformed into *E. coli* Rosetta II cells (Invitrogen) to produce recombinant protein with an N-terminal hexa-histidine tag followed by an MBP. Protein expression was induced in Luria-Bertani Medium (LB) with 1 mM IPTG at 37°C for 3 hours. Bacteria were pelleted by centrifugation, resuspended in a minimal volume of buffer (20 mM HEPES pH 7.5, 200 mM NaCl, 20 mM imidazole, 1 mM DDM (Anatrace)) and lysed by sonication. The lysate was clarified by centrifugation and incubated with Ni chelating resin (GE Healthcare) pre-equilibrated in lysis buffer. Protein elution was performed by an imidazole step-gradient. Fractions containing ExsB were pooled and dialyzed for 2 hours at 4°C into 20 mM HEPES pH 7.5, 200 mM NaCl, 20 mM imidazole, and subsequently incubated with 1 unit of thrombin protease per mg of MBP-ExsB. The protein was

subsequently reincubated with the Ni Sepharose resin and the eluted cleaved product dialysed 2 hours into 20 mM HEPES pH 7.5, 20 mM NaCl. ExsB was then loaded onto a 1 ml prepacked cation exchange column (Hitrap SP XL; GE HealthCare) pre-equilibrated in a low salt concentration buffer (20 mM HEPES pH 7.5, 20 mM NaCl, 1mM DDM). Elution of the pure, concentrated protein, was achieved by a step-gradient elution with a high salt concentration buffer (20 mM HEPES pH 7.5, 500 mM NaCl, 1 mM DDM). ExsB was further concentrated to 5 mg/ml and used for crystallization tests.

Selenomethionylated ExsB was expressed in *E. coli* Rosetta II cells in M9 minimal medium supplemented with thiamine (200 mg/L), leucine (50 mg/L), valine (50 mg/L), isoleucine (50 mg/L), lysine (100 mg/L), phenylalanine (100 mg/L), threonine (100 mg/L) and selenomethionine (60 mg/L). Expression and purification was performed as for the native protein.

Crystallization, data collection, and structure solution

Crystals of both native and selenomethionylated ExsB were grown by the hanging-drop vapor diffusion method at 20°C in 0.1 M Tris-HCl pH 8.5, 1.5 M (NH₄)₂SO₄, and 0-10 % glycerol. 1 µL of protein solution at 5 mg/mL was mixed with 1 µL of mother liquor, and the drop was sealed onto a 1 mL reservoir. Crystals were cryoprotected by brief soaking in mother liquor containing 20% glycerol, and were subsequently flash-cooled in liquid nitrogen directly on the loop used for data collection. A SAD experiment was performed on the Se edge on beamline ID23-EH1 at the European Synchrotron Radiation Facility (ESRF). The dataset from the SAD experiment, collected to 3.0 Å, was processed and scaled with XDS⁴⁸, revealing a C2 space group. Identification of selenium atom positions, refinement, phasing and automatic model building were performed with PHENIX⁴⁹. PHASER⁵⁰ was

subsequently used to perform molecular replacement using the model generated by the SAD experiment in order to phase a native data set (1.8 Å, space group C2) collected at the ESRF on beamline ID14-EH1. Cycles of manual building were performed using Coot ⁵¹ coupled with refinement cycles by REFMAC 5.5 ⁵².

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank J. Marquez and the HTX Lab team (Partnership for Structural Biology) for access to and help with high-throughput crystallization, Carlos Contreras-Martel (Bacterial Pathogenesis Group, IBS) for helpful suggestions on data collection and structure refinement, Romé Voulhoux for anti-XcpY antibodies, Sophie de Bentzmann for anti-Dsb antibodies, and Maria Guillermina Casabona (Bacterial Pathogenesis and Cellular Responses Group, iRTSV) for help with membrane separation experiments. This work was supported by grants from the French Cystic Fibrosis Foundation (Vaincre la Mucoviscidose; VLM, to A.D. and I.A.) and the Direction des Sciences du Vivant (DSV), CEA. T. I. was supported by a Ph.D. fellowship from the VLM and C.P. by a fellowship from the IRTTELIS-DSV program.

ACCESSION NUMBERS

Coordinates and structure factors have been deposited in the Protein Data Bank with accession number 2YJL.

REFERENCES CITED

- 1 Lister, P. D., Wolter, D. J. & Hanson, N. D. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin. Microbiol. Rev.* **22**, 582-610. (2009).
- 2 Blocker, A. J. *et al.* What's the point of the type III secretion system needle? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 6507-6513. (2008).
- 3 Cornelis, G. R. The type III secretion injectisome. *Nat. Rev. Microbiol.* **4**, 811-825. (2006).
- 4 Izoré, T., Job, V. & Dessen, A. Biogenesis, regulation, and targeting of the type III secretion system. *Structure* **19**, 603-612. (2011).
- 5 Marlovits, T. C. & Stebbins, C. E. Type III secretion systems shape up as they ship out. *Curr. Opin. Microbiol.* **13**, 1-6. (2009).
- 6 Mattei, P.-J. *et al.* Membrane targeting and pore formation by the type III secretion system translocon. *FEBS J.* **278**, 414-426. (2011).
- 7 Galán, J. E. Common themes in the design and function of bacterial effectors. *Cell Host Microbe* **5**, 571-579. (2009).
- 8 Goure, J., Broz, P., Attree, O., Cornelis, G. R. & Attree, I. Protective anti-V antibodies inhibit *Pseudomonas* and *Yersinia* translocon assembly within host membranes. *J. Infect. Dis.* **192**, 218-225. (2005).
- 9 Hauser, A. R. The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by infection. *Nat. Rev. Microbiol.* **7**, 654-665. (2009).
- 10 Worrall, L. J., Lameignere, E. & Strynadka, N. C. Structural overview of the bacterial injectisome. *Curr. Opin. Microbiol.* **14**, 3-8. (2011).
- 11 Deane, J. E., Abrusci, P., Johnson, S. & Lea, S. M. Timing is everything: the regulation of type III secretion. *Cell Mol. Life Sci.* **67**, 1065-1075. (2010).
- 12 Hodgkinson, J. L. *et al.* Three-dimensional reconstruction of the *Shigella* T3SS transmembrane regions reveals 12-fold symmetry and novel features throughout. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **5**, 477-485. (2009).
- 13 Reichow, S. L., Korotkov, K. V., Hol, W. G. J. & Gonen, T. Structure of the cholera toxin secretion channel in its closed state. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17**, 1226-1233. (2010).

- 14 Schraidt, O. *et al.* Topology and organization of the *Salmonella typhimurium* type III secretion needle complex components. *PLoS Pathogens* **6**, e1000824 (2010).
- 15 Spreter, T. *et al.* A conserved structural motif mediates formation of the periplasmic rings in the type III secretion system. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **5**, 468-476. (2009).
- 16 Burghout, P. *et al.* Role of the pilot protein YscW in the biogenesis of the YscC secretin in *Yersinia enterocolitica*. *J. Bacteriol.* **186**, 5366-5375. (2004).
- 17 Crago, A. M. & Koronakis, V. *Salmonella* InvG forms a ring-like multimer that requires the InvH lipoprotein for outer membrane localization. *Mol. Microbiol.* **30**, 47-56. (1998).
- 18 Daefler, S. & Russel, M. The *Salmonella typhimurium* InvH protein is an outer membrane lipoprotein required for the proper localization of InvG. *Mol. Microbiol.* **28**, 1367-1380. (1998).
- 19 Nakano, N., Kubori, T., Knoshita, M., Imada, K. & Nagai, H. Crystal structure of *Legionella* DotD: insights into the relationship between Type IVb and Type II/III secretion systems. *PloS Pathog.* **6**, e1001129. (2010).
- 20 Balasingham, S. V. *et al.* Interactions between the lipoprotein PilP and the secretin PilQ in *Neisseria meningitidis*. *J. Bacteriol.* **189**, 5716-5727. (2007).
- 21 Jain, S. *et al.* Structural characterization of outer membrane components of the type IV pili system in pathogenic *Neisseria*. *PloS ONE* **6**, e16624. (2011).
- 22 Koo, J. *et al.* PilF is an outer membrane lipoprotein required for multimerization and localization of the *Pseudomonas aeruginosa* type IV pilus secretin. *J. Bacteriol.* **190**, 6961-6969. (2008).
- 23 Guilvout, I., Chami, M., Engel, A., Pugsley, A. P. & Bayan, N. Bacterial outer membrane secretin PulD assembles and inserts into the inner membrane in the absence of its pilotin. *EMBO J.* **25**, 5241-5249. (2006).
- 24 Hardie, K. R., Lory, S. & Pugsley, A. P. Insertion of an outer membrane protein in *Escherichia coli* requires a chaperone-like protein. *EMBO J.* **15**, 978-988. (1996).
- 25 Hardie, K. R., Seydel, A., Guilvout, I. & Pugsley, A. P. The secretin-specific chaperone-like protein of the general secretory pathway: separation of proteolytic protection and piloting functions. *Mol. Microbiol.* **5**, 967-976. (1996).
- 26 Lario, P. I. *et al.* Structure and biochemical analysis of a secretin pilot protein. *EMBO J.* **24**, 1111-1121. (2005).
- 27 Okon, M. *et al.* Structural characterization of the type III pilot-secretin complex from *Shigella flexneri*. *Structure* **16**, 1544-1554. (2008).
- 28 Schuch, R. & Maurelli, A. T. MxiM and MxiJ, base elements of the Mxi-Spa type III

- secretion system of *Shigella*, interact with and stabilize the MxiD secretin in the cell envelope. *J. Bacteriol.* **183**, 6991-6998. (2001).
- 29 Bayan, N., Guilvout, I. & Pugsley, A. P. Secretins take shape. *Mol. Microbiol.* **60**, 1-4. (2006).
- 30 Remans, K., Vercammen, K., Bodilis, J. & Cornelis, P. Genome-wide analysis and literature-based survey of lipoproteins in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol.* **156**, 2597-2607. (2010).
- 31 Viarre, V. *et al.* HxcQ liposecretin is self-piloted to the outer membrane by its N-terminal lipid anchor. *J. Biol. Chem.* **284**, 33815-33823. (2009).
- 32 Troisfontaines, P. & Cornelis, G. R. Type III secretion: more systems than you think. *Physiology* **20**, 326-339. (2005).
- 33 Juncker, A. S. *et al.* Prediction of lipoprotein signal peptides in Gram-negative bacteria. *Protein Sci.* **12**, 1652-1662. (2003).
- 34 Allaoui, A., Scheen, R., Rouvroit, C. L. & Cornelis, G. R. VirG, an *Yersinia enterocolitica* lipoprotein involved in Ca²⁺ dependency, is related to ExsB of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **177**, 4230-4237. (1995).
- 35 Brutinel, E. D., Vakulskas, C. A. & Yahr, T. L. ExsD inhibits expression of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system by disrupting ExsA self-association and DNA binding activity. *J. Bacteriol.* **192**, 1479-1486. (2010).
- 36 Thibault, J., Faudry, E., Ebel, C., Attree, I. & Elsen, S. Anti-activator ExsD forms a 1:1 complex with ExsA to inhibit transcription of type III secretion operons. *J. Biol. Chem.* **284**, 15762-15770. (2009).
- 37 Goranson, J., Hovey, A. K. & Franck, D. W. Functional analysis of *exsC* and *exsB* in regulation of exoenzyme S production by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **179**, 1646-1654. (1997).
- 38 Dasgupta, N., Ashare, A., Hunninghake, G. W. & Yahr, T. L. Transcriptional induction of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system by low Ca²⁺ and host cell contact proceeds through two distinct signaling pathways. *Infection and immunity* **74**, 3334-3341 (2006).
- 39 Sigal, C. T., Zhou, W., Buser, C. A., McLaughlin, S. & Resh, M. D. Amino-terminal basic residues of Src mediate membrane binding through electrostatic interaction with acidic phospholipids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 12253-12257. (1994).
- 40 Bentham, M., Mazaleyrat, S. & Harris, M. Role of myristoylation and N-terminal basic residues in membrane association of the human immunodeficiency virus type 1 Nef protein. *J. Gen. Virol.* **87**, 563-571. (2006).
- 41 Laskowski, R. A. SURFNET: a program for visualizing molecular surfaces, cavitites, and intermolecular interactions. *J. Mol. Graph.* **13**, 323-330. (1995).

- 42 Golovanov, A. P. *et al.* The solution structure of a domain from the *Neisseria meningitidis* lipoprotein PilP reveals a new β -sandwich fold. *J. Mol. Biol.* **364**, 186-195. (2006).
- 43 Carbonnelle, E., Helaine, S., Prouvensier, L., Nassif, X. & Pelicic, V. Type IV pilus biogenesis in *Neisseria meningitidis*: PilW is involved in a step occurring after pilus assembly, essential for fibre stability and function. *Mol. Microbiol.* **55**, 54-64. (2005).
- 44 Trindade, M. B., Job, V., Contreras-Martel, C., Pelicic, V. & Dessen, A. Structure of a widely conserved type IV pilus biogenesis factor which affects the stability of secretin multimers. *J. Mol. Biol.* **378**, 1031-1031-1039. (2008).
- 45 Kim, K. *et al.* Crystal structure of PilF: functional implication in the type 4 pilus biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **340**, 1028-1038. (2006).
- 46 Dacheux, D., Attree, I., Schneider, C. & Toussaint, B. Cell death of human polymorphonuclear neutrophils induced by a *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolate requires a functional type III secretion system. *Infect. Immun.* **67**, 6164-6167. (1999).
- 47 Goure, J. *et al.* The V antigen of *Pseudomonas aeruginosa* is required for assembly of the functional PopB/PopD translocation pore in host cell membranes. *Infect. Immun.* **72**, 4741-4750. (2004).
- 48 Kabsch, W. XDS. *Acta Crystallogr. sect. D* **66**, 125-132. (2010).
- 49 Adams, P. D. *et al.* PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr. sect. D* **D66**, 213-221. (2010).
- 50 Storoni, L., McCoy, A. & Read, R. Likelihood-enhanced fast rotation functions. *Acta Crystallogr. sect. D* **57**, 1373-1382 (2004).
- 51 Emsley, P. & Cowtan, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr. sect. D* **60**, 2126-2132. (2004).
- 52 Murshudov, G., Vagin, A. & Dodson, E. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr. sect. D* **53**, 240-255. (1997).

V.1 Discussion

Le système de sécrétion de type III est une machinerie très complexe. L'étude des interactions protéines-protéines est donc d'une importance capitale pour comprendre la biogenèse et le fonctionnement de ce facteur de virulence majeur pour *P. aeruginosa*. ExsB est une lipoprotéine ancrée dans la membrane externe et pourrait stabiliser PscC, la sécrétine du système. Nous avons montré pour la première fois que ExsB était exprimée au sein du système de sécrétion chez *Pseudomonas*. Sa présence au sein de l'opéron de régulation est cependant surprenante mais étant membranaire, sa contribution à la régulation génétique du système ne semble pas envisageable. La structure de ExsB est formée de deux feuillets bêta et ne permet pas d'expliquer sa fonction de « pilotine ». L'identification d'un complexe ExsB-PscC pourrait enfin valider le rôle de ExsB comme étant la pilotine du système. La structure de ce complexe, point culminant de l'étude, permettrait de comprendre comment ExsB stabilise la sécrétine PscC. La forte homologie de séquence entre ExsB-PscC et YscW-YscC ainsi qu'avec tout les homologues du systèmes Ysc rend cette étude très intéressante pour de nombreux pathogènes.

Autres articles publiés sur le Système de Sécrétion de Type III - Revues -

Au cours de mon programme de thèse, j'ai participé à l'écriture de deux revues sur le système de sécrétion de type III. L'une d'entre elles est basée sur la biogenèse de la base du système (revue I) et la deuxième décrit plus précisément le pore de translocation (revue II).

I Biogenesis, regulation, and targeting of the Type III Secretion System

Résumé : Le système de sécrétion de type III est utilisé par de nombreux pathogènes à Gram négatif, pour injecter des toxines directement dans le cytoplasme des cellules eucaryotes. La biogenèse de cette nano machine nécessite la coopération de plus d'une vingtaine de protéines cytoplasmiques, périplasmiques et membranaires impliquées dans des processus de polymérisation, d'interactions protéiques et de dénaturation partielle. Les éléments de ce complexe macromoléculaire ont été caractérisés par microscopie électronique, résonance magnétique nucléaire et cristallographie aux rayons x, ce qui a permis de mieux comprendre la régulation spatiotemporelle du système. Dans cette revue, nous décrivons les récentes avancées structurales ainsi que l'identification de ligands jouant le rôle d'inhibiteur pour le système de sécrétion de type III.

Biogenesis, Regulation, and Targeting of the Type III Secretion System

Thierry Izoré,^{1,2,3} Viviana Job,^{1,2,3} and Andréa Dessen^{1,2,3,*}

¹Bacterial Pathogenesis Group

²Commissariat à l'Energie Atomique

³Centre National de la Recherche Scientifique

Institut de Biologie Structurale, Université Grenoble I, 41 rue Jules Horowitz, 38027 Grenoble, France

*Correspondence: andrea.dessen@ibs.fr

DOI 10.1016/j.str.2011.03.015

The type III secretion system (T3SS) is employed by a number of Gram-negative bacterial pathogens to inject toxins into eukaryotic cells. The biogenesis of this complex machinery requires the regulated interaction between over 20 cytosolic, periplasmic, and membrane-imbedded proteins, many of which undergo processes such as polymerization, partner recognition, and partial unfolding. Elements of this intricate macromolecular system have been characterized through electron microscopy, crystallography, and NMR techniques, allowing for an initial understanding of the spatiotemporal regulation of T3SS-related events. Here, we report recent advances in the structural characterization of T3SS proteins from a number of bacteria, and provide an overview of recently identified small molecule T3SS inhibitors that could potentially be explored for novel antibacterial development.

Introduction

Type III secretion systems (T3SSs) are widespread macromolecular nanomachines that allow a number of human, plant, and animal pathogens to inject toxins directly into the cytoplasm of eukaryotic cells. Although toxin effects can be distinct, ranging from establishment of symbiosis to pathogenic effects such as cytoskeletal rearrangement, membrane disruption, and initiation of apoptosis, the T3SS apparatus itself has been shown to display notable similarities within different bacterial species (Cornelis, 2006; Galán, 2009). T3SSs are composed of three main “parts”: the basal body, a multi-ring system that spans both bacterial membranes; a hollow needle-like structure through which toxins have been proposed to travel in semi-unfolded form (these two systems together are often globally referred to as the “needle complex”); and the translocon, a pore inserted into the target eukaryotic membrane formed by two T3SS hydrophobic proteins that associate with the needle through a hydrophilic “bridging” partner, the latter of which plays an important role in immune system modulation (Blocker et al., 2008; Gendrin et al., 2010; Mattei et al., 2011; Mueller et al., 2008). The basal body itself is intimately associated with a number of cytoplasmic and membrane proteins (the “export apparatus”) (Figure 1), which renders the base secretion competent (Diepold et al., 2010; Wagner et al., 2010). Thus, the T3SS assemblies involve over 20 different proteins (Marlovits and Stebbins, 2010; Moraes et al., 2008; Mueller et al., 2008; Worrall et al., 2011), and are genetically and structurally related to the bacterial flagellum (Blocker et al., 2003). In addition many proteins involved in T3SS biogenesis are produced in the bacterial cytoplasm in complex with cognate chaperones, adding to the arsenal of molecules whose expression, secretion, and/or translocation must be under tight regulatory control. Notably, despite the overall similarity of T3SSs among different bacterial species, genes that code for individual components often do not follow the same organizational profile within T3SS-encoding

operons, with the most notable distinctions being identified for genes involved in the regulatory cascade and for the basal body itself (Figure 2).

Studies of the individual steps involved in T3SS biogenesis, as well as of the locations of different proteins within the assembled systems and potential conformational changes required for T3SS activation, have been hampered by a number of factors. In addition to the sheer complexity of the system, the membranous or fibrous character of a number of the proteins involved in forming the T3SS and the relatively low resolutions of electron microscopy maps used for protein localization have in the past often led to conflicting results. However, recently, elegant cryomicroscopy studies of purified needle complexes, crystal structures of the soluble domains of proteins involved in basal body formation or host cell interaction, and NMR and FTIR analyses of needle proteins have greatly advanced our structural knowledge of the T3SS. In addition high-resolution crystal structures of all classes of T3SS chaperones are now available, allowing for more detailed study of the structural requirements for partner stabilization in the bacterial cytoplasm. This review will focus on the most recent advances in structural characterization of many of these components and will explore how this knowledge can help in the development of novel antibacterial agents targeting these multifaceted assemblies.

Detailed Features and Assembly of the Basal Body

Assembly of a secretion- and injection-competent T3SS occurs in a stepwise fashion and involves three major steps: (1) formation of the basal body, including outer membrane and inner membrane rings; (2) assembly of the needle substructure; and (3) secretion and localization of translocon-forming proteins onto the target cell membrane (Figure 1; see Movie S1 available online). The basal body consists of two sets of rings of different diameters, positioned within both the outer and inner bacterial membranes (and, thus, will be referred to as OMR and IMR).

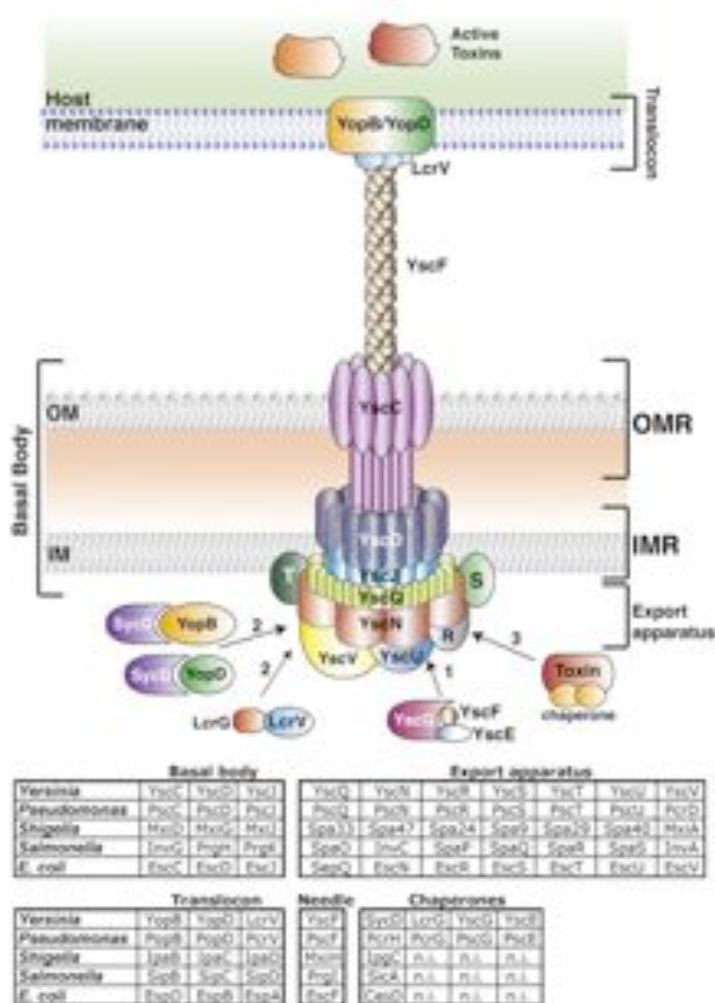


Figure 2. Schematic Diagram of the T355 of *Yersinia* spp.

The basal body is a multi-ring structure that anchors the system to the two bacterial membranes. Upon its formation the needle protein potentially travels through the rings (step 1) and self-polymerizes on the outside of the bacterium. Subsequently, translocator proteins (step 2) are secreted, and finally, toxins/effectors are injected into the eukaryotic cytoplasm (step 3) (see Movie S1). The table includes homologous proteins in *Pseudomonas*, *Shigella*, *Salmonella*, and pathogenic *E. coli* spp. n.i., molecules that were not yet identified.

of the *Salmonella* IMR. The data indicated that PrgK forms the smaller, IMR and is buried within the outer PrgH assembly, an observation supported by the fact that the N and C termini of PrgH are located on different sides of the inner membrane, with the C terminus facing the periplasm and, thus, contacting the secretin InvG (see below) [Schraidi et al., 2010].

The GMR is formed primarily by a component of the secretin family. Secretins, which are composed of a N-terminal periplasmic region and a conserved membrane-inserted "secretin homology region" at the C-terminal end, form highly stable oligomers, typically with 12–14 subunits. Secretin oligomerization creates central pores large enough to allow the secretion of unfolded or partially folded proteins and are often the GMR-forming structures in bacterial secretion systems [Cham et al., 2005; Hodgkinson et al., 2009; Reichow et al., 2010; Schraide et al., 2010]. In recent reconstructions of *Salmonella* and *Shigella* needle complexes, the secretin protrudes into the periplasmic space, forming a "neck" region that is potentially formed by its N terminus and directly contacts the MR [Hodgkinson et al., 2009; Schraide et al., 2010].

In the well-studied *Yersinia*, *Shigella*, *Salmonella*, and *E. coli* systems, the basal body seems to be composed of three distinct proteins that form oligomers displaying at least 12-fold symmetry (although in some systems, higher order has been reported) (Hodgkinson et al., 2009; Schnadt et al., 2010; Spreter et al., 2009).

The IMR, proposed to be the first ring to be assembled within the base (Kimbrough and Miller, 2002), is composed of two proteins (YscJ/MxiJ/PrpK, and YscD/MxiG/PrpH in *Yersinia*, Shigella, and *Salmonella* spp., Figures 1 and 3) that oligomerize to form two concentric rings of different diameters. Recently, through a combination of cryo-electron microscopy, single-particle analysis, and surface-labeling studies, Schnaith et al. (2010) confirmed that PrpK and PrpH are the main components

2010). This observation was confirmed by experiments in which the crystal structure of the soluble N-terminal domain of EscC (the *E. coli* secretin) was docked into the *S. typhimurium* T255 electron density map. This not only showed that this region can be successfully positioned adjacent to the C-terminal secretin core but also that it can act as a bridge between the C-terminal region of the secretin and other periplasmic components. Notably, EscC₂₁₋₂₇₄ displays a modular fold with two small α/β domains separated by a flexible linker (Figure 3), an arrangement that is shared by the periplasmic domains of secretins of other secretion systems, such as GspD from the T255 of *Vibrio cholerae* (Korotkov et al., 2009), and DotD from the T4655 of *Legionella pneumophila* (Nakano et al., 2010). Importantly, the interdomain linker was shown by mutagenesis to play a key role in

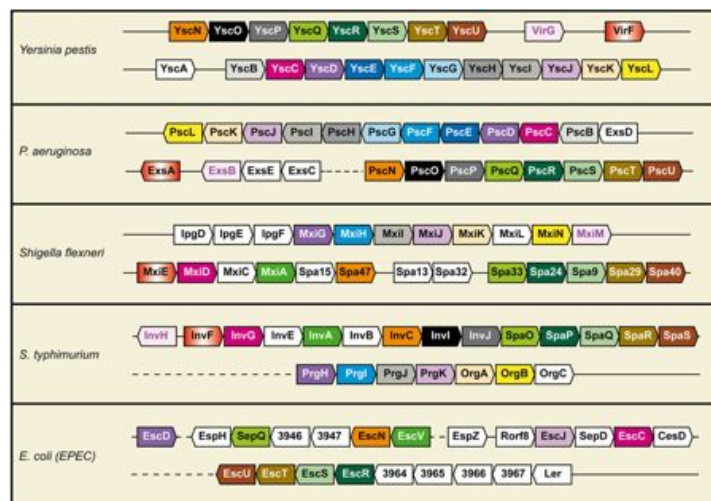


Figure 2. Organization of T3SS Operons in Different Bacterial Species

Only operons containing transcriptional regulators, basal body, and needle formation genes are shown. Strains include *Yersinia pestis* CO29 (NC_003143), *P. aeruginosa* PAO1 (NC_002516), *S. flexneri* 301 (NC_004851), *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2 (NC_003197), and *E. coli* (enteropathogenic) O127:H6 E2348/69 (NC_011601). Homologous genes are highlighted in the same color.

a single holo structure. Interestingly, Diepold et al. (2010), by studying the *Yersinia* Ysc system, also concluded that such an assembly is required for formation of the needle complex, although in this case formation of the OMR (harboring the secretin) precedes that of the IMR. These findings suggest that despite their overall structural similarity, T3SS from different microorganisms can display distinct biogenesis pathways.

A number of individual components of the export apparatus have been the

secretion through the T3SS. Thus, it is conceivable that this flexibility allows for structural rearrangements previously observed in the outer membrane (OM) region and that are essential for T3SS functionality (Marlovits et al., 2006; Spreter et al., 2009).

Secretin functionality within the OM requires key molecules, such as pilins and other lipoproteins, which participate in membrane recognition, oligomerization, and stabilization of their cognate secretin within the bilayer (Burghout et al., 2004; Trindade et al., 2008; Zenk et al., 2007). Pilins are relatively small (15 kDa), essential proteins that display a classic lipoprotein LxGC lipidation motif at their N terminus. To date, the only available pilin structure is that of MxiM (Figure 3), which stabilizes MxiD, the T3SS secretin from *Shigella flexneri* (Lario et al., 2005). MxiM folds into a "cracked b-barrel" displaying a 8 Å wide, 20 Å deep central groove that binds a negatively charged lipid. Recently, Okon et al. (2008) solved the structure of MxiM in the presence of the C-terminal peptide from the secretin MxiD, and showed that, upon binding, this unstructured region folds into a turn-helix motif that covers the hydrophobic cavity. This mechanism could prevent the secretin from being prematurely inserted into the OM (Okon et al., 2008). The same authors propose that despite low sequence identities, pilins from different species or secretion systems could act in a similar fashion.

Assembly of the Inner Membrane Export Apparatus

Subsequent to assembly of the basal body, this structure must be rendered competent for secretion (Kubori et al., 2000; Sukhan et al., 2001). This function is accomplished by the "export apparatus," which involves a number of membrane proteins that are conserved both at the genetic and structural level in a number of bacterial species (Figures 1–3). In the *Salmonella* SPI-1 T3SS, the export apparatus is formed by InvA, SpaP, SpaQ, SpaR, and SpaS. Recently, Wagner et al. (2010) showed that membrane proteins from the *Salmonella* export apparatus form a platform onto which the needle complex can assemble within

object of structural studies, and the most recent, exciting work has concentrated on membrane protein YscU (*Yersinia*) and homologs Spa40 (*S. flexneri*), SpaS (*S. typhimurium*), and EscU (*E. coli*). These proteins possess four transmembrane helices and a long cytoplasmic C-terminal tail that undergoes autocleavage, which was suggested as being a mechanism employed by the T3SS to switch from the secretion of early to late substrates. The globular fold of these "molecular switches" consists of a five-stranded mixed β sheet surrounded by four α helices; a surface-located type II β -turn harbors the NPTH cleavage motif (Figure 3). Cleavage has been proposed to generate a conformational modification and a subsequent locally modified electrostatic surface that plays a key role in the interaction with other components of the export apparatus. Mutations that block the cleavage reaction render the system defective for secretion of needle subunits (see below) and translocation of pore-forming proteins, and highlight the potential importance of the conformational modification in specificity of secreted substrates (Deane et al., 2008, 2010; Lountos et al., 2009; Sorg et al., 2007; Worrall et al., 2011; Zarivach et al., 2008).

InvA from *S. typhimurium* is the largest protein of the export apparatus for which structural data are available, but its role in T3SS functionality remains largely unknown. It consists of a highly conserved 35 kDa N-terminal region predicted to contain seven transmembrane helices and a 40 kDa cytoplasmic soluble domain, potentially located within the cytoplasm. The structure of the latter domain reveals a compact globular fold harboring four subdomains (SD1–SD4, Figure 3) (Lilic et al., 2010; Worrall et al., 2010). Of note is the fact that the structure of the first subdomain (SD1) is highly reminiscent of that of the peripheral stalk of the archaeal A_0A_1 ATPases. In light of the fact that FlhA, the flagellar homolog of InvA, has been shown to interact with the ATPase Flil (Minamino and Namba, 2008) it is conceivable that SD1 could potentially interact with the T3SS ATPase (Worrall et al., 2010). Strikingly, SD2 shares

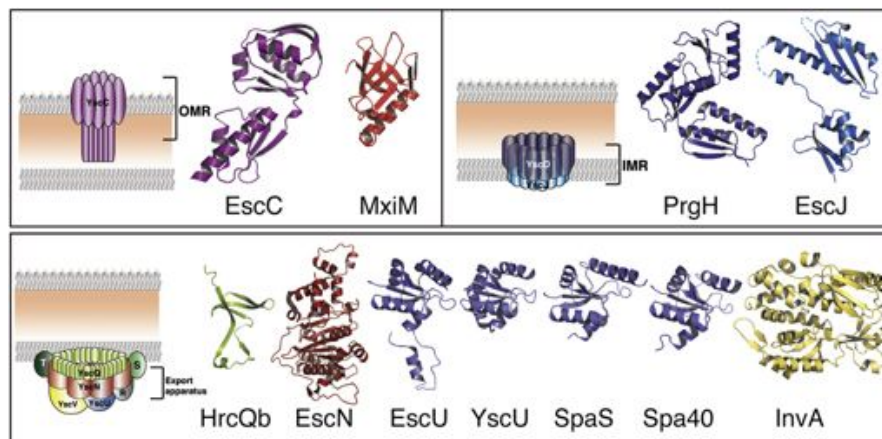


Figure 3. Structural Overview of the T3SS Base-Forming Proteins

Top left shows OMR-forming proteins: EscC (Protein Data Bank ID code 3GR5) and MxiM (1Y9T). Top right illustrates IMR-forming proteins: PrgH (3GR1) and EscJ (1YJ 7). Bottom shows export apparatus: HrcQb (YscQ-homolog; 1O9Y); EscN (2OBL); EscU (3BZL); YscU (2J LH); SpaS (3C01); Spa40 (2VT1); and InvA (2X49).

a remarkable structural similarity with the folds of PrgH, YscJ, GspD, and EscC. These molecules have all been proposed to associate into rings, which leads to the tempting suggestion that InvA (and its homologs) could itself potentially form ring-like structures. However, this type of oligomeric association has not been observed for InvA. Thus, the C-terminal domain of InvA could function as a mediator of interactions with other T3SS components or with the membrane itself (Lilic et al., 2010; Worral et al., 2010).

T3SSs harbor an essential ATPase (InvC/Spa47/YscN in *Salmonella*, *Shigella*, and *Yersinia* spp, respectively) that is among the best-conserved proteins of the export apparatus, due to the fact that it displays high sequence homology among different species and is closely related to the flagellar FliI ATPase (Cornelis, 2006). Although the structure of the ATPase will not be discussed in the context of this review, it is of interest that it has been implicated in chaperone/substrate recognition and subsequent dissociation and unfolding of substrates, in a process that utilizes ATP hydrolysis to energize effector secretion but also depends on the proton motive force (Akedo and Galán, 2005; Lorenz and Büttner, 2009; Minamino and Namba, 2008; Zarivach et al., 2007). However, the precise mechanism of this process remains to be determined, especially in light of recent findings that report that the InvC ATPase is not necessary for formation of the chaperone-sorting platform in *Salmonella* spp (Lara-Tejero et al., 2011). Inhibition of ATPase activity by a partner molecule has been reported in the *Yersinia* system, where YscL (a homolog of flagellar FliH) interacts with YscN whether the bacterium is secreting effectors or not. This interaction could be involved in tethering YscN to the export apparatus itself (Blaylock et al., 2006).

Injectisome Biogenesis: Needle Formation and Regulation

Once the OMR/IMR and the export apparatus are in place, the T3SS needle is synthesized (Sukhan et al., 2001). The T3SS needle

is formed by a single protein that is synthesized in the cytoplasm and polymerized only after secretion to the surface (Kubori et al., 2000; Marlovits et al., 2004; Quinaud et al., 2005). Polymerization is ensured by amino acids residing in the C-terminal region of these highly helical proteins; in fact most structures of needle proteins in monomeric forms are C-terminal truncations (Deane et al., 2006; Wang et al., 2007; Zhang et al., 2006). Thus, within the bacterial cytoplasm, the T3SS needle-forming protein must be prevented from undergoing self-assembly or it will be rapidly degraded (Plé et al., 2010; Quinaud et al., 2005). This task is accomplished by sequestering of the C-terminal residues of T3SS needle proteins by their cognate chaperones (see below).

Although the mechanism of cytoplasmic stabilization of the needle protein seems to be well established, that of needle polymerization has been a matter of fascinating controversy. Overexpression of needle proteins generates fibers with lengths >1 μm (Quinaud et al., 2005), potentially following a monodirectional assembly pattern where protomers are added to the tip (Poyraz et al., 2010). Cordes et al. (2003) docked the crystal structure of *S. flexneri* MxiH onto a 17 Å electron microscopy reconstruction of the purified needles, suggesting that polymerization occurs through head-to-tail association of MxiH monomer. However, recently, Poyraz et al. (2010) recorded time-dependent Fourier transform infrared (FTIR) spectra of *Salmonella* PrgI and identified a backbone a helix-to-b strand conversion that involves approximately 20% of the residues and occurs concomitantly with needle polymerization. Analysis of the polymerized PrgI structure by solid-state NMR revealed that these conformational changes occur within the highly conserved 18 C-terminal residues of PrgI, which suggests that such a fiber-formation mechanism could be common to different species (Poyraz et al., 2010). The commonality of the T3SS fiber-formation mechanism could be an interesting and tractable Achilles' heel that could be exploited toward the development of novel antibacterials and/or vaccines (see below).

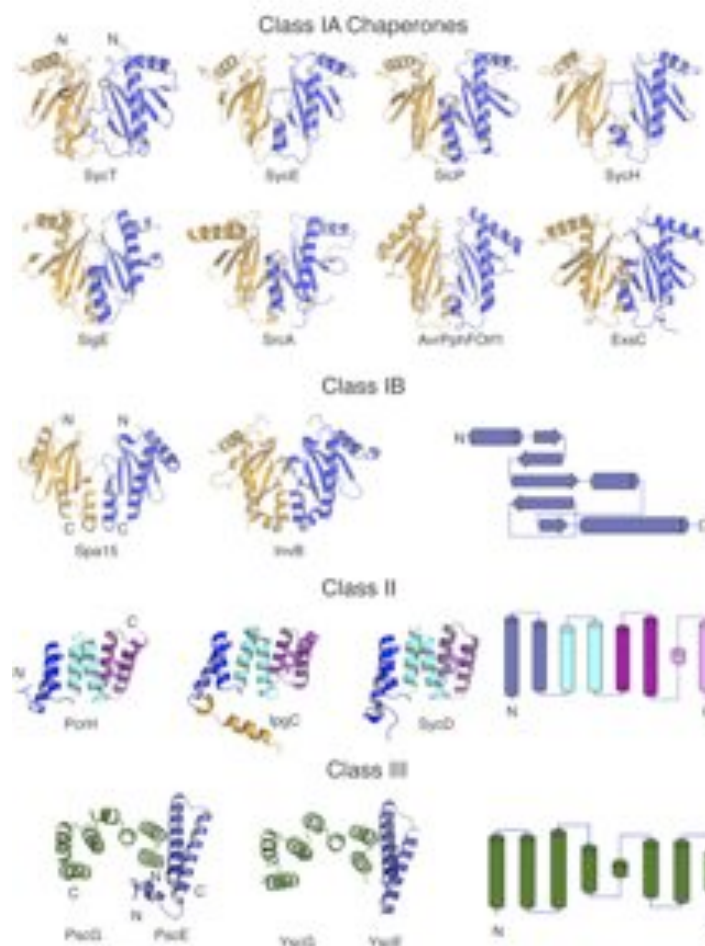


Figure 4. A Gallery of T3SS Chaperones

Class IA and IB chaperones share a common overall heart-shaped structure, whereas class II and class III chaperones display TPR-like folds. In the latter class, a smaller partner protein (blue) is required to stabilize the main chaperone (green). Depicted molecules in the gallery include SycT (Q85), SycE (J) YAL, SycP (J) YOL, SycH (J) TTN, SycF (K) JSL, SycA (J) PUS, AvrPphC (J) S2B, ExoC (K) OY, Sps15 (J) RYB, InvB (J) M8, PcrH (J) XCB, IpgC (J) GZD, SycD (J) GXG, PscD-PscE (J) QUV, and YscG-YscH (J) QMS.

low sequence identities but similar biochemical features, including a small size (typically between 110 and 160 residues) and an acidic pI (Parsot et al., 2003).

Class I chaperones are the most extensively studied because a large number of structures have been reported either in apo or effector-bound form. The two subclasses of chaperones share the same overall heart-shaped dimeric structure, which consists of a twisted β sheet with two or three lateral α helices. The major secondary structure element of the interface is the "dimerization helix," which runs parallel in class IA molecules and at an angle in class IB (van Eerde et al., 2004). It is of interest that the recent structure of a complex between a short region of ExoE, an effector involved in transcriptional activation in *P. aeruginosa*, and its cognate chaperone ExoC also reveals that the latter carries a class IA fold (Vogelaar et al., 2010), even though ExoE is not a molecule that will directly affect the target cell but rather a member of a transcriptional regulation cascade (Thibault et al., 2009).

Class II and class III chaperones, although binding to molecules that carry totally different functions, have remarkably similar structures. Both classes display tetratricopeptide (TPR) folds composed of three TPR motifs each (TPR motifs are characterized by two antiparallel helices). TPR-harboring proteins are widespread in eukaryotic organisms and are involved in the establishment of protein-protein contacts (Grove et al., 2008). Class II chaperones bind to and stabilize the hydrophobic translocation-forming molecules; intriguingly, the same chaperone recognizes both the major T3SS translocator (two potential transmembrane regions) and the minor translocator (one potential TM). The question of how a single, small chaperone can bind to two different molecules of much greater size has been a matter of controversy (Barta et al., 2010; Büttner et al., 2008; Job et al., 2010; Lunelli et al., 2009; Mattei et al., 2011). The structures of class II chaperones PcrH (*P. aeruginosa*) and IpgC (*S. flexneri*) in complex with short regions from both translocator homologs reveal that both 1:1 and 2:1 stoichiometries are possible, with the concave

Chaperones of Toxins and T3SS Building Blocks

Prior to becoming engaged either in formation of the T3SS apparatus or being injected into the target cytoplasm in order to manipulate host cell function, most T3SS secretion substrates are present in the bacterial cytoplasm in complex with dedicated chaperones. These proteins, which sequester substrates in a secretion-competent state (Stebbins and Galán, 2001), have been organized into three classes, depending on the partner they recognize. Class I chaperones recognize one (IA) or more (IB) effector molecules, whereas class II chaperones interact with translocators, and class III chaperones sequester the needle-forming proteins, impairing self-polymerization (Cornelis, 2006; Parsot et al., 2003). Although many laboratories have been working on structure and function of T3SS chaperones for a number of years, it is only recently, with the solution of a number of class II structures, that the gallery of chaperone folds could be completed (Figure 4). All chaperone classes share

totally different functions, have remarkably similar structures. Both classes display tetratricopeptide (TPR) folds composed of three TPR motifs each (TPR motifs are characterized by two antiparallel helices). TPR-harboring proteins are widespread in eukaryotic organisms and are involved in the establishment of protein-protein contacts (Grove et al., 2008). Class II chaperones bind to and stabilize the hydrophobic translocation-forming molecules; intriguingly, the same chaperone recognizes both the major T3SS translocator (two potential transmembrane regions) and the minor translocator (one potential TM). The question of how a single, small chaperone can bind to two different molecules of much greater size has been a matter of controversy (Barta et al., 2010; Büttner et al., 2008; Job et al., 2010; Lunelli et al., 2009; Mattei et al., 2011). The structures of class II chaperones PcrH (*P. aeruginosa*) and IpgC (*S. flexneri*) in complex with short regions from both translocator homologs reveal that both 1:1 and 2:1 stoichiometries are possible, with the concave

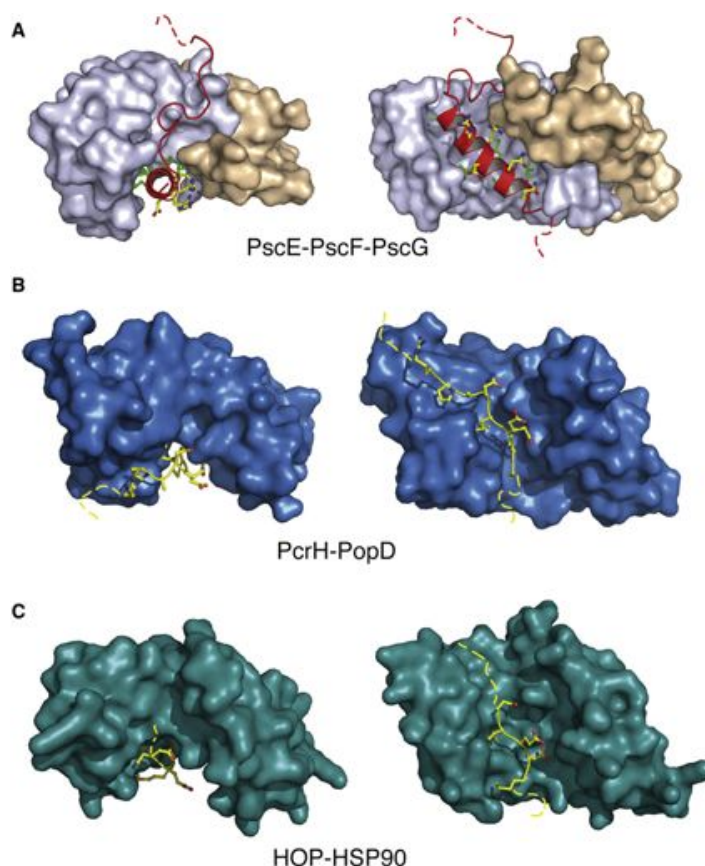


Figure 5. TPR Folds Recognize Helical and Stretched Peptides

(A) A prototypical class III chaperone, PscG (light blue), is shown in complex with PscE (light brown) and the C-terminal region of PscF (red). The interaction between PscF and PscG is mediated by an amphipathic helix located within the concave region of the PscG TPR fold (Quinaud et al., 2007); hydrophobic residues are shown in green, hydrophilic in yellow.

(B) PcrH, a class II chaperone, in complex with a peptide from PopD (yellow), which also occupies the concave region of the TPR fold of PcrH but in outstretched form (J ob et al., 2010).

(C) Eukaryotic TPR-containing HOP in complex with a peptide from Hsp90; here, the concave region of the TPR is also recognized by an outstretched peptide (Scheufler et al., 2000). Hsp90 interacts with HOP in an elongated fashion, highly similar to PcrH:PopD. Structures on the right are rotated axially by 90° in relation to the ones on the left.

within the PscF-PscG interaction region abrogate PscF secretion and, thus, starkly diminish the cytotoxicity potential of *Pseudomonas* (Plé et al., 2010). It is of note that BLAST analyses of the three proteins involved in the ternary complex described above reveal a limited number of “clear hits.” Needle proteins with considerable sequence identity (especially in the C-terminal helix) could be identified in species including *Vibrio parahaemolyticus*, *Photobacterium luminescens*, *S. flexneri*, and *Aeromonas hydrophila* (Quinaud et al., 2007; Tan et al., 2009), although PscE and PscG homologs could not be identified in *Shigella*. This could potentially suggest slight modifications in the needle regulation mechanisms in the latter organism.

region of the TPR fold always occupied, independently of which partner is bound (J ob et al., 2010; Lokareddy et al., 2010; Lunelli et al., 2009). This interaction region is essential for T3SS functionality because mutations that affect the hydrophobic contacts abrogate secretion and, consequently, cytotoxicity of a clinical *Pseudomonas* strain (J ob et al., 2010).

In *Pseudomonas* and *Yersinia*, needle proteins PscF and YscF are found in the bacterial cytoplasm associated with a complex between a class III chaperone (PscG and YscG) and a partner protein (PscE and YscE) (Quinaud et al., 2007; Sun et al., 2008). The structure of the PscE-PscF⁵⁵⁻⁸⁵-PscG complex from *P. aeruginosa*, which includes the full C-terminal region of PscF but lacks the N-terminal helical hairpin observed in other monomeric needle protein structures (Deane et al., 2006; Wang et al., 2007), reveals that the C terminus of PscF folds into an amphipathic helix that is stabilized by the concave region of PscG's TPR (Figure 5A). Notably, PscF does not interact with PscE, whose role seems to be the stabilization of PscG; this is also observed in the YscE/YscF/YscG complex from *Yersinia* (Quinaud et al., 2007; Sun et al., 2008). Mutations

Although both class II and class III chaperones display TPR folds, their bound substrates display distinct secondary structure profiles. PscG/YscG recognize the fiber-forming C termini of PscF/YscF that form stable amphipathic helices, with the hydrophobic helical half facing the interior of the TPR's concave region and the polar half facing the solvent (Quinaud et al., 2007; Sun et al., 2008) (Figure 5A). However, class II chaperones recognize outstretched peptides (Figure 5B) (J ob et al., 2010; Lunelli et al., 2009). It is precisely the latter form of recognition that emulates the binding mode of eukaryotic TPR-carrying molecules to their targets, as seen for example in the complex between adaptor protein HOP (Hsp-organizing protein) and the outstretched C terminus of Hsp90 (Figure 5C) (Cortajarena et al., 2010; Kajander et al., 2009; Scheufler et al., 2000). Because eukaryotic TPRs have been the targets for the development of small molecule inhibitors, this common mode of binding suggests that lessons derived from studies in blocking protein-protein interactions in eukaryotic TPR systems could be adapted to TPRs that play key roles in bacterial infection, as is the case of the T3SS (see below).

The gallery of T3SS chaperone structures shown in Figure 4, which clearly reveals only two main general folds, brings up yet another interesting point. Class II and class III chaperones bind early secretion substrates, such as needle proteins and translocators, whose timely polymerization or oligomerization is necessary for formation of the T3SS itself—these fold into all-helical TPRs. Class I chaperones, which stabilize late substrates (effectors and toxins that are secreted/injected only after the T3SS structure is fully formed) are mixed α/β structures. This observation suggests that the structure of the chaperone itself may contain an “early substrate”/“late substrate” signal (Job et al., 2010) and plays a key role in the temporal secretion order of T3SS substrates (Birtalan et al., 2002). The recent report that chaperones are recognized by a secretion-sorting platform located at the base of the T3SS (Lara-Tejero et al., 2011) is an additional indication of the complexity of the role played by chaperones in the T3SS regulation mechanism.

Small Molecule Inhibitors as Virulence Blockers

In the face of the growing problem of antimicrobial resistance, identified for almost every class of antibiotic that is presently on the market, the search for new drug development targets has been a strategy of choice for a number of laboratories. Traditional antibiotics target cell wall biosynthesis, protein synthesis, DNA replication, and RNA transcription, and due to the essential nature of these processes for bacterial growth and survival, ligands that block them impose selective pressure that leads to the eventual development of resistance. Naturally, an alternative strategy would be to target processes that are not absolutely required for bacterial survival, such as the T3SS, but whose inhibition would stymie infectivity or disrupt the interaction between pathogen and host. This approach could potentially decrease the selective pressure for development of resistance, allowing the bacterium to be cleared by the immune system with limited impact on the host (Clatworthy et al., 2007; Keyser et al., 2008).

Most of the molecules identified as being inhibitors of the T3SS have been done so by chemical screening, which have identified compounds that broadly inhibit a large number of T3SS-carrying pathogens. However, up until now, few laboratories have characterized the precise macromolecular target of the inhibitors identified; notable exceptions are benzimidazoles, which have been shown to inhibit the transcription factors LcrF of *Y. pseudotuberculosis* (Garitty-Ryan et al., 2010) and ExsA from *P. aeruginosa* (Grier et al., 2010) (Figure 6A). Notably, structurally unrelated molecules (such as salicylidene acylhydrazides and thiazolidinones, Figures 6B and 6C) have been reported to affect needle complex formation or assembly in distinct systems, and to block secretion without affecting cell viability of both extracellular and intracellular pathogens, including *Yersinia*, *Shigella*, *Chlamydia*, and *Salmonella* spp (Aiello et al., 2010; Muschiol et al., 2006; Negrea et al., 2007; Nordfelth et al., 2005; Veenendaal et al., 2009; Wolf et al., 2006). *Shigella* cells treated with salicylidene acylhydrazides revealed defects in needle assembly that resembled those of mutants with modifications in the T3SS export apparatus (Veenendaal et al., 2009), whereas *S. typhimurium* cells grown in the presence of a thiazolidinone displayed a decreased amount in needle complex proteins (Felise et al., 2008). Interestingly, the latter molecule also had an effect on the T3SS of *Yersinia*, the T2S system of *Pseudomonas*, and the

T4P secretion system of *Francisella* spp, leading the authors to suggest that its main macromolecular target could be the secretin, a common OM element (Felise et al., 2008). Thiazolidinones have also been reported as inhibiting systems not related to bacterial infection, which suggests that they could represent multifaceted therapeutic agents (Dayam et al., 2006).

Sulfonyl amino benzanilides (Figure 6D) and salicylidene anilides (Figure 6E) have been shown to affect expression of T3SS-related genes in enteropathogenic *E. coli* and block different pathways leading to secretion of effectors in *Yersinia* spp (Gauthier et al., 2005; Kauppi et al., 2003). In addition, caminoside A, a glycolipid isolated from a marine sponge (Figure 6F), was shown to inhibit secretion by enteropathogenic *E. coli* (Linington et al., 2002). However, further development of these initial hits into novel potential antibiotics will require the characterization of their macromolecular targets and considerable structural efforts leading to small molecule improvement.

An alternative strategy to cell-based screening for inhibitor identification involves the exploration of possible ligand recognition sites on the high-resolution structure of a potential target. The essential nature of T3SS chaperones for infectivity, the availability of a number of such structures from different pathogens, and the identification of TPR chaperone-effector interactions that are essential for maintenance of pathogenesis (Bröms et al., 2006; Job et al., 2010; Lunelli et al., 2009; Quinaud et al., 2007) suggest that obstruction of such protein-protein interactions could represent a yet unexplored approach toward T3SS inhibitor development. Within eukaryotic systems, an example of the success of this strategy involves Hsp90, a ubiquitous chaperone that aids in the folding process of a number of oncogenic proteins and recognizes TPR modules. The Hsp90-TPR interaction is of interest for the development of novel antineoplasia treatments, and molecules that specifically inhibit the interaction between Hsp90 and the TPR domain of its partner molecule HOP have been identified and shown to be effective in vivo (Yi and Regan, 2008). As discussed above, a number of pathogens carry T3SS class II chaperones that bind a section of their cognate substrates as outstretched peptides in a strikingly similar fashion to the HOP-Hsp90 complex (Scheffler et al., 2000). This observation suggests that the concave region of bacterial TPRs could also be targeted by small molecule inhibitors, as is the case for Hsp90-HOP. Initial evidence confirming this hypothesis is available in the authors' laboratory; proof that such molecules could have an effect in vivo will require further experimentation.

Conclusions

Despite the extraordinary effort made by a number of laboratories in the past few years to structurally and functionally characterize the T3SS, several questions still remain unanswered. One major point of interest is the nature of the signal that cues the bacterium into initiating the secretion of T3SS components upon recognition that a target cell is to be attacked. Another area where to date little progress has been made is the structural characterization of the translocon, and the mode of its association with the T3SS needle. Two of the translocon components have been shown to fold as molten globules, even in the presence of their cognate chaperones; subsequent to recognition of the target lipid interface, they become membrane imbedded

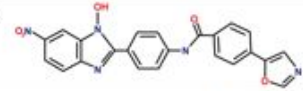
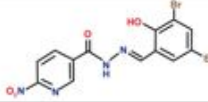
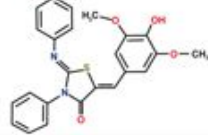
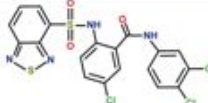
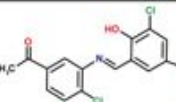
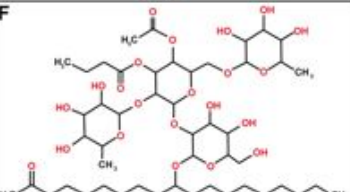
Chemical structure	compound name	Effect
A 	Benzimidazole	Inhibition of the transcription factors: LcrF of <i>Y. pseudotuberculosis</i> ExsA of <i>P. aeruginosa</i>
B 	Salicylidene acylhydrazide	Affects needle complex formation Blocks secretion in <i>Yersinia</i> , <i>Shigella</i> , <i>Chlamydia</i> and <i>Salmonella</i>
C 	2-imino-5-arylidene thiazolidinone	Affects needle complex formation Affects T3SS of <i>Yersinia</i> , T2S of <i>Pseudomonas</i> T4P of <i>Francisella</i>
D 	Sulfonylaminobenzanilide	Affects expression of T3SS genes in EPEC
E 	Salicylanilide	Blocks secretion of effectors in <i>Yersinia</i>
F 	Caminoside A	Blocks secretion in EPEC

Figure 6. Representative Structures of Small Molecules that Inhibit the T3SS

The right side of the figure describes inhibition effects observed mostly through the employment of cellular-based assays.

and oligomerize. The complexity of these events could require the employment of novel methodologies for their structural characterization, including preparation of samples in lipid nanodiscs (Katayama et al., 2010), meso (lipidic cubic phases) crystallization (Johansson et al., 2009), or a combination of cryo-electron tomography and 3D image averaging (Bartesaghi and Subramaniam, 2009). In addition, given the interest in exploring the T3SS as a target for antimicrobial development, it seems likely that the system will continue to be the object of significant structural and functional efforts.

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information includes one movie and can be found with this article online at doi:10.1016/j.str.2011.03.015.

ACKNOWLEDGMENTS

Work in the Dessen laboratory is supported by grants from the French Cystic Fibrosis Foundation (Vaincre la Mucoviscidose; VLM) and the Direction des Sciences du Vivant, Commissariat à l'Energie Atomique. T.I. was supported by a Ph.D. fellowship from the VLM. We thank E. Faudry (IRTSV Grenoble) for

critical reading of the manuscript. The authors wish to thank J.-L. Parouty (Institut de Biologie Structurale IT team) for help with generation of the T3SS animation.

REFERENCES

- Aiello, D., Williams, J.D., Majgier-Baranowska, H., Patel, I., Peet, N.P., Huang, J., Lory, S., Bowlin, T.L., and Moir, D.T. (2010). Discovery and characterization of inhibitors of *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 1988–1999.
- Akeda, Y., and Galán, J.E. (2005). Chaperone release and unfolding of substrates in type III secretion. *Nature* 437, 911–915.
- Barta, M.L., Zhang, L., Picking, W.L., and Geisbrecht, B.V. (2010). Evidence for alternative quaternary structure in a bacterial type III secretion system chaperone. *BMC Struct. Biol.* 10, 21.
- Bartesaghi, A., and Subramaniam, S. (2009). Membrane protein structure determination using cryo-electron tomography and 3D image averaging. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 19, 402–407.
- Birtalan, S.C., Phillips, R.M., and Ghosh, P. (2002). Three-dimensional secretional signals in chaperone-effector complexes of bacterial pathogens. *Mol. Cell* 9, 971–980.
- Blaylock, B., Riordan, K.E., Missiakas, D.M., and Schneewind, O. (2006). Characterization of the *Yersinia enterocolitica* type III secretion ATPase YscN and its regulator. *J. Bacteriol.* 188, 3525–3534.

- Blocker, A., Komoriya, K., and Aizawa, S. (2003). Type III secretion systems and bacterial flagella: insights into their function from structural similarities. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 3027–3030.
- Blocker, A.J., Deane, J.E., Veenendaal, A.K., Roversi, P., Hodgkinson, J.L., Johnson, S., and Lea, S.M. (2008). What's the point of the type III secretion system needle? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 6507–6513.
- Bröms, J.E., Edqvist, P.J., Forsberg, A., and Francis, M.S. (2006). Tetratricopeptide repeats are essential for PcrH chaperone function in *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion. *FEMS Microbiol. Lett.* 256, 57–66.
- Burghout, P., Beckers, F., de Wit, E., van Bortel, R., Cornelis, G.R., Tommasen, J., and Koster, M. (2004). Role of the pilot protein YscW in the biogenesis of the YscC secretin in *Yersinia enterocolitica*. *J. Bacteriol.* 186, 5366–5375.
- Büttner, C.R., Sorg, I., Cornelis, G.R., Heinz, D.W., and Niemann, H.H. (2008). Structure of the *Yersinia enterocolitica* type III secretion translocator chaperone SycD. *J. Mol. Biol.* 375, 997–1012.
- Chami, M., Guilvout, I., Gregorini, M., Remigny, H.W., Muller, S.A., Valerio, M., Engel, A., Pugsley, A.P., and Bayan, N. (2005). Structural insights into the secretin PulD and its trypsin-resistant core. *J. Biol. Chem.* 280, 37732–37741.
- Clatworthy, A.E., Pierson, E., and Hung, D.T. (2007). Targeting virulence: a new paradigm for antimicrobial therapy. *Nat. Chem. Biol.* 3, 541–548.
- Cordes, F.S., Komoriya, K., Larquet, E., Yang, S., Egelman, E.H., Blocker, A., and Lea, S.M. (2003). Helical structure of the needle of the type III secretion system of *Shigella flexneri*. *J. Biol. Chem.* 278, 17103–17107.
- Cornelis, G.R. (2006). The type III secretion injectisome. *Nat. Rev. Microbiol.* 4, 811–825.
- Cortajarena, A.L., Wang, J., and Regan, L. (2010). Crystal structure of a designed tetratricopeptide repeat module in complex with its peptide ligand. *FEBS J.* 277, 1058–1066.
- Dayam, R., Aiello, F., Deng, J., Wu, Y., Garofalo, A., Chen, X., and Neamati, N. (2006). Discovery of small molecule integrin α v β 3 antagonists as novel anticancer agents. *J. Med. Chem.* 49, 4526–4534.
- Deane, J.E., Roversi, P., Cordes, F.S., Johnson, S., Kenjale, R., Daniell, S., Booy, F., Picking, W.D., Picking, W.L., Blocker, A.J., and Lea, S.M. (2006). Molecular model of a type III secretion needle: implications for host-cell sensing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 12529–12533.
- Deane, J.E., Graham, S.C., Mitchell, E.P., Flot, D., Johnson, S., and Lea, S.M. (2008). Crystal structure of Spa40, the specificity switch for the *Shigella flexneri* type III secretion system. *Mol. Microbiol.* 69, 267–276.
- Deane, J.E., Abruscio, P., Johnson, S., and Lea, S.M. (2010). Timing is everything: the regulation of type III secretion. *Cell. Mol. Life Sci.* 67, 1065–1075.
- Diepold, A., Amstutz, M., Abel, S., Sorg, I., Jenal, U., and Cornelis, G.R. (2010). Deciphering the assembly of the *Yersinia* type III secretion injectisome. *EMBO J.* 29, 1928–1940.
- Felise, H.B., Nguyen, H.V., Pfuetzner, R.A., Barry, K.C., Jackson, S.R., Blanc, M.P., Bronstein, P.A., Kline, T., and Miller, S.I. (2008). An inhibitor of Gram-negative bacterial virulence protein secretion. *Cell Host Microbe* 4, 325–336.
- Galán, J.E. (2009). Common themes in the design and function of bacterial effectors. *Cell Host Microbe* 5, 571–579.
- Garrity-Ryan, L.K., Kim, O.K., Balada-Llasat, J.M., Bartlett, V.J., Verma, A.K., Fisher, M.L., Castelli, C., Songsunthong, W., Tanaka, S.K., Levy, S.B., et al. (2010). Small molecule inhibitors of LcrF, a *Yersinia pseudotuberculosis* transcription factor, attenuate virulence and limit infection in a murine pneumonia model. *Infect. Immun.* 78, 4683–4690.
- Gauthier, A., Robertson, M.L., Lowden, M., Ibarra, J.A., Puente, J.L., and Finlay, B.B. (2005). Transcriptional inhibitor of virulence factors in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 4101–4109.
- Gendrin, C., Sarrazin, S., Bonaffé, D., Jault, J.M., Lortat-Jacob, H., and Dessen, A. (2010). Hijacking of the pleiotropic cytokine interferon- γ by the type III secretion system of *Yersinia pestis*. *PLoS One* 5, e15242.
- Grier, M.C., Garrity-Ryan, L.K., Bartlett, V.J., Klausner, K.A., Donovan, P.J., Dudley, C., Alekshun, M.N., Tanaka, S.K., Draper, M.P., Levy, S.B., and Kim, O.K. (2010). N-Hydroxybenzimidazole inhibitors of ExsA MAR transcription factor in *Pseudomonas aeruginosa*: in vitro anti-virulence activity and metabolic stability. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 20, 3380–3383.
- Grove, T.Z., Cortajarena, A.L., and Regan, L. (2008). Ligand binding by repeat proteins: natural and designed. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 18, 507–515.
- Hodgkinson, J.L., Horsley, A., Stabat, D., Simon, M., Johnson, S., da Fonseca, P.C., Morris, E.P., Wall, J.S., Lea, S.M., and Blocker, A.J. (2009). Three-dimensional reconstruction of the *Shigella* T3SS transmembrane regions reveals 12-fold symmetry and novel features throughout. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16, 477–485.
- Job, V., Mattei, P.J., Lemaire, D., Attree, I., and Dessen, A. (2010). Structural basis of chaperone recognition by type III secretion system minor translocator proteins. *J. Biol. Chem.* 285, 23224–23232.
- Johansson, L.C., Wöhri, A.B., Katona, G., Engström, S., and Neutze, R. (2009). Membrane protein crystallization from lipidic phases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 19, 372–378.
- Kajander, T., Sachs, J.N., Goldman, A., and Regan, L. (2009). Electrostatic interactions of Hsp-organizing protein tetratricopeptide domains with Hsp70 and Hsp90. *J. Biol. Chem.* 284, 25364–25374.
- Katayama, H., Wang, J., Tama, F., Chollet, L., Gogol, E.P., Collier, R.J., and Fisher, M.T. (2010). Three-dimensional structure of the anthrax toxin pore inserted into lipid nanodiscs and lipid vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 3453–3457.
- Kauppi, A.M., Nordfelth, R., Uvell, H., Wolf-Watz, H., and Elofsson, M. (2003). Targeting bacterial virulence: inhibitors of type III secretion in *Yersinia*. *Chem. Biol.* 10, 241–249.
- Keyser, P., Elofsson, M., Rosell, S., and Wolf-Watz, H. (2008). Virulence blockers as alternatives to antibiotics: type III secretion inhibitors against Gram-negative bacteria. *J. Intern. Med.* 264, 17–29.
- Kimbrough, T.G., and Miller, S.I. (2002). Assembly of the type III secretion needle complex of *Salmonella typhimurium*. *Microbes Infect.* 4, 75–82.
- Korotkov, K.V., Pardon, E., Steyaert, J., and Hol, W.G.J. (2009). Crystal structure of the N-terminal domain of the secretin GspD from ETEC determined with the assistance of a nanobody. *Structure* 17, 255–265.
- Kubori, T., Sukhan, A., Aizawa, S.-I., and Galán, J.E. (2000). Molecular characterization and assembly of the needle complex of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 10225–10230.
- Lara-Tejero, M., Kato, J., Wagner, S., Liu, X., and Galán, J.E. (2011). A sorting platform determines the order of protein secretion in bacterial type III systems. *Science* 331, 1188–1191.
- Lario, P.I., Pfuetzner, R.A., Frey, E.A., Creagh, L., Haynes, C., Maurelli, A.T., and Strynadka, N.C. (2005). Structure and biochemical analysis of a secretin pilot protein. *EMBO J.* 24, 1111–1121.
- Lilic, M., Quezada, C.M., and Stebbins, C.E. (2010). A conserved domain in type III secretion links the cytoplasmic domain of InvA to elements of the basal body. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 66, 709–713.
- Linington, R.G., Robertson, M.L., Gauthier, A., Finlay, B.B., van Soest, R., and Andersen, R.J. (2002). Caminoside A, an antimicrobial glycolipid isolated from the marine sponge *Caminus sphaeroconia*. *Org. Lett.* 4, 4089–4092.
- Lokareddy, R.K., Lunelli, M., Eilers, B., Wolter, V., and Kolbe, M. (2010). Combination of two separate binding domains defines stoichiometry between type III secretion system chaperone IpgC and translocator protein IpaB. *J. Biol. Chem.* 285, 39965–39975.
- Lorenz, C., and Büttner, D. (2009). Functional characterization of the type III secretion ATPase from the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria. *J. Bacteriol.* 191, 1414–1428.
- Lountos, G.T., Austin, B.P., Nallamsetty, S., and Waugh, D.S. (2009). Atomic resolution structure of the cytoplasmic domain of *Yersinia pestis* YscU, a regulatory switch involved in type III secretion. *Protein Sci.* 18, 467–474.
- Lunelli, M., Lokareddy, R.K., Zychlinsky, A., and Kolbe, M. (2009). IpaB-IpgC interaction defines binding motif for type III secretion translocator. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 9661–9666.
- Marlovits, T.C., and Stebbins, C.E. (2010). Type III secretion systems shape up as they ship out. *Curr. Opin. Microbiol.* 13, 47–52.



- Marlovits, T.C., Kubori, T., Sukhan, A., Thomas, D.R., Galán, J.E., and Unger, V.M. (2004). Structural insights into the assembly of the type III secretion needle complex. *Science* **306**, 1040–1042.
- Marlovits, T.C., Kubori, T., Lara-Tejero, M., Thomas, D., Unger, V.M., and Galán, J.E. (2006). Assembly of the inner rod determines needle length in the type III secretion injectisome. *Nature* **441**, 637–640.
- Mattei, P.J., Faudry, E., Job, V., Izoré, T., Attree, I., and Dessen, A. (2011). Membrane targeting and pore formation by the type III secretion system translocon. *FEBS J.* **278**, 414–426.
- Minamino, T., and Namba, K. (2008). Distinct roles of the Flil ATPase and proton motive force in bacterial flagellar protein export. *Nature* **451**, 485–489.
- Moraes, T.F., Spreter, T., and Strynadka, N.C.J. (2008). Piecing together the type III injectisome of bacterial pathogens. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **18**, 258–266.
- Mueller, C.A., Broz, P., and Cornelis, G.R. (2008). The type III secretion system tip complex and translocon. *Mol. Microbiol.* **68**, 1085–1095.
- Muschiol, S., Bailey, L., Gylfe, A., Sundin, C., Hultenby, K., Bergstrom, S., Elofsson, M., Wolf-Watz, H., Normark, S., and Henriques-Normark, B. (2006). A small-molecule inhibitor of type III secretion inhibits different stages of the infectious cycle of *Chlamydia trachomatis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 14566–14571.
- Nakano, N., Kubori, T., Knoshita, M., Imada, K., and Nagai, H. (2010). Crystal structure of *Legionella* DotD: insights into the relationship between type IVb and type II/III secretion systems. *PLoS Pathog.* **6**, e1001129.
- Negrea, A., Bjur, E., Ygberg, S.E., Elofsson, M., Wolf-Watz, H., and Rhen, M. (2007). Salicylidene acylhydrazides that affect type III protein secretion in *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**, 2867–2876.
- Nordfelth, R., Kauppi, A.M., Norberg, H.A., Wolf-Watz, H., and Elofsson, M. (2005). Small-molecule inhibitors specifically targeting type III secretion. *Infect. Immun.* **73**, 3104–3114.
- Okon, M., Moraes, T.F., Lario, P.I., Creagh, A.L., Haynes, C.A., Strynadka, N.C., and McIntosh, L.P. (2008). Structural characterization of the type III pilot-secretin complex from *Shigella flexneri*. *Structure* **16**, 1544–1554.
- Parsot, C., Hamiaux, C., and Page, A.-L. (2003). The various and varying roles of specific chaperones in type III secretion systems. *Curr. Opin. Microbiol.* **6**, 7–14.
- Plé, S., Job, V., Dessen, A., and Attree, I. (2010). Co-chaperone interactions in export of the type III needle component PscF of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **192**, 3801–3808.
- Poyraz, Ö., Schmidt, H., Seidel, K., Delissen, F., Ader, C., Tenenboim, H., Goosmann, C., Laube, B., Thünemann, A.F., Zychlinsky, A., et al. (2010). Protein refolding is required for assembly of the type three secretion needle. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17**, 788–794.
- Quinaud, M., Chabert, J., Faudry, E., Neumann, E., Lemaire, D., Pastor, A., Elsen, S., Dessen, A., and Attree, I. (2005). The PscE-PscF-PscG complex controls type III secretion needle biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* **280**, 36293–36300.
- Quinaud, M., Ple, S., Job, V., Contreras-Martel, C., Simorre, J.-P., Attree, I., and Dessen, A. (2007). Structure of the heterotrimeric complex that regulates type III secretion needle formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 7803–7808.
- Reichow, S.L., Korotkov, K.V., Hol, W.G.J., and Gonen, T. (2010). Structure of the cholera toxin secretion channel in its closed state. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17**, 1226–1233.
- Scheufler, C., Brinker, A., Bourenkov, G., Pergoraro, S., Moroder, L., Bartunik, H., Hart, F.U., and Moarefi, I. (2000). Structure of TPR domain-peptide complexes: critical elements in the assembly of the Hsp70-Hsp90 multichaperone machine. *Cell* **101**, 199–210.
- Schraidt, O., Lefebvre, M.D., Brunner, M.J., Schmied, W.H., Schmidt, A., Radics, J., Mechtler, K., Galán, J.E., and Marlovits, T.C. (2010). Topology and organization of the *Salmonella typhimurium* type III secretion needle complex components. *PLoS Pathog.* **6**, e1000824.
- Sorg, I., Wagner, S., Amstutz, M., Muller, S.A., Broz, P., Lussi, Y., Engel, A., and Cornelis, G.R. (2007). YscU recognizes translocators as export substrates of the *Yersinia* injectisome. *EMBO J.* **26**, 3015–3024.
- Spreter, T., Yip, C.K., Sanowar, S., André, I., Kimbrough, T.G., Vuckovic, M., Pluetzner, R.A., Deng, W., Yu, A.C., Finlay, B.B., et al. (2009). A conserved structural motif mediates formation of the periplasmic rings in the type III secretion system. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**, 468–476.
- Stebbins, C.E., and Galán, J.E. (2001). Maintenance of an unfolded polypeptide by a cognate chaperone in bacterial type III secretion. *Nature* **414**, 77–81.
- Sukhan, A., Kubori, T., Wilson, J., and Galán, J.E. (2001). Genetic analysis of assembly of the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium type III secretion-associated needle complex. *J. Bacteriol.* **183**, 1159–1167.
- Sun, P., Tropea, J.E., Austin, B.P., Cherry, S., and Waugh, D.S. (2008). Structural characterization of the *Yersinia pseudotuberculosis* type III secretion system needle protein YscF in complex with its heterodimeric chaperone YscE/YscG. *J. Mol. Biol.* **377**, 819–830.
- Tan, Y.W., Yu, H.B., Leung, K.Y., Sivaraman, J., and Mok, Y.K. (2009). Mapping of the chaperone AcrH binding regions of translocators AopB and AopD and characterization of oligomeric and metastable AcrH-AopB-AopD complexes in the type III secretion system of *Aeromonas hydrophila*. *Protein Sci.* **18**, 1724–1734.
- Thibault, J., Faudry, E., Ebel, C., Attree, I., and Elsen, S. (2009). Anti-activator ExsD forms a 1:1 complex with ExsA to inhibit transcription of type III secretion operons. *J. Biol. Chem.* **284**, 15762–15770.
- Trindade, M.B., Job, V., Contreras-Martel, C., Pelicic, V., and Dessen, A. (2008). Structure of a widely conserved type IV pilus biogenesis factor which affects the stability of secretin multimers. *J. Mol. Biol.* **378**, 1031–1039.
- van Erde, A., Hamiaux, C., Perez, J., Parsot, C., and Dijkstra, B.W. (2004). Structure of Spa15, a type III secretion chaperone from *Shigella flexneri* with broad specificity. *EMBO Rep.* **5**, 477–483.
- Veenendaal, A.K.J., Sundin, C., and Blocker, A.J. (2009). Small-molecule type III secretion system inhibitors block assembly of the *Shigella* type III secretin. *J. Bacteriol.* **191**, 563–570.
- Vogelaar, N.J., Jing, X., Robinson, H.H., and Schubot, F.D. (2010). Analysis of the crystal structure of the ExsC-ExsE complex reveals distinctive binding interactions of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion chaperone ExsC with ExsE and ExsD. *Biochemistry* **49**, 5870–5879.
- Wagner, S., Königsmäier, L., Lara-Tejero, M., Lefebvre, M.D., Marlovits, T.C., and Galán, J.E. (2010). Organization and coordinated assembly of the type III secretion export apparatus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**, 17745–17750.
- Wang, Y., Ouellette, A.N., Egan, C.W., Rathinavelan, T., Im, W., and De Guzman, R.N. (2007). Differences in the electrostatic surfaces of the type III secretion needle proteins PrgI, BsaL, and MxiH. *J. Mol. Biol.* **371**, 1304–1314.
- Wolf, K., Betts, H.J., Chellas-Gery, B., Hower, S., Linton, C.N., and Fields, K.A. (2006). Treatment of *Chlamydia trachomatis* with a small molecule inhibitor of the *Yersinia* type III secretion system disrupts progression of the chlamydial developmental cycle. *Mol. Microbiol.* **61**, 1543–1555.
- Worrall, L.J., Vuckovic, M., and Strynadka, N.C. (2010). Crystal structure of the C-terminal domain of the *Salmonella* type III secretion system export apparatus protein InvA. *Protein Sci.* **19**, 1091–1096.
- Worrall, L.J., Lameignere, E., and Strynadka, N.C. (2011). Structural overview of the bacterial injectisome. *Curr. Opin. Microbiol.* **14**, 3–8.
- Yi, F., and Regan, L. (2008). A novel class of small molecule inhibitors of Hsp90. *ACS Chem. Biol.* **3**, 645–654.
- Zarivach, R., Vuckovic, M., Deng, W., Finlay, B.B., and Strynadka, N.C. (2007). Structural analysis of a prototypical ATPase from the type III secretion system. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **14**, 131–137.
- Zarivach, R., Deng, W., Vuckovic, M., Felise, H.B., Nguyen, H.V., Miller, S.I., Finlay, B.B., and Strynadka, N.C. (2008). Structural analysis of the essential self-cleaving type III secretion proteins EscU and SpaS. *Nature* **453**, 124–128.
- Zenk, S.F., Stabat, D., Hodgkinson, J.L., Veenendaal, A.K., Johnson, S., and Blocker, A.J. (2007). Identification of minor inner-membrane components of the *Shigella* type III secretion system 'needle complex'. *Microbiology* **153**, 2405–2415.
- Zhang, L., Wang, Y., Picking, W.L., Picking, W.D., and De Guzman, R.N. (2006). Solution structure of monomeric BsaL, the type III secretion needle protein of *Burkholderia pseudomallei*. *J. Mol. Biol.* **359**, 322–330.

II Membrane targeting and pore formation by the Type III Secretion System Translocon

Résumé : Le Système de Sécrétion de Type III est un complexe macromoléculaire utilisé par de nombreux pathogènes pour initier le mécanisme d'infection. Les toxines sont synthétisées au sein du cytoplasme bactérien et transitent par le système de sécrétion de type III traversant les deux membranes bactériennes pour être injectées directement dans le cytoplasme de la cellule-cible eucaryote. Un élément essentiel au fonctionnement du T3SS est le « translocon » qui constitue un pore enchâssé dans la membrane eucaryote. Ce translocon est formé par trois partenaires protéiques ; Deux protéines sont hydrophobes, la troisième est hydrophile et permet l'association avec l'aiguille. Dans cette revue, nous décrivons les aspects biochimiques et structuraux des protéines impliquées dans la formation du pore de translocation ainsi que leur participation dans la modification des processus cellulaires eucaryotes au cours de l'infection.

Contribution: Ma contribution à cette revue est principalement la rédaction de la section traitant de l'ATPase du système. J'ai aussi participé à la réalisation des figures.

REVIEW ARTICLE

Membrane targeting and pore formation by the type III secretion system translocon

Pierre-Jean Mattei¹, Eric Faudry², Viviana Job¹, Thierry Izoré¹, Ina Attree² and Andréa Dessen¹

¹ Bacterial Pathogenesis Group, Institut de Biologie Structurale, UMR 5075 (CNRS/CEA/UJF), Grenoble, France

² Bacterial Pathogenesis and Cellular Responses Team, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Université Joseph Fourier (UJF), LBBSI, IRTSV, CEA, Grenoble, France

Keywords

bacterial infection; injection; membrane; pore formation; secretion; toxin

Correspondence

A. Dessen, Bacterial Pathogenesis Group, Institut de Biologie Structurale, UMR 5075 (CNRS/CEA/UJF), 41 rue Jules Horowitz, 38027 Grenoble, France
Fax: +33 4 38 78 54 94
Tel: +33 4 38 78 95 90
E-mail: andrea.dessen@ibs.fr

(Received 21 September 2010, revised 4 November 2010, accepted 26 November 2010)

doi:10.1111/j.1742-4658.2010.07974.x

The type III secretion system (T3SS) is a complex macromolecular machinery employed by a number of Gram-negative species to initiate infection. Toxins secreted through the system are synthesized in the bacterial cytoplasm and utilize the T3SS to pass through both bacterial membranes and the periplasm, thus being introduced directly into the eukaryotic cytoplasm. A key element of the T3SS of all bacterial pathogens is the translocon, which comprises a pore that is inserted into the membrane of the target cell, allowing toxin injection. Three macromolecular partners associate to form the translocon: two are hydrophobic and one is hydrophilic, and the latter also associates with the T3SS needle. In this review, we discuss recent advances on the biochemical and structural characterization of the proteins involved in translocon formation, as well as their participation in the modification of intracellular signalling pathways upon infection. Models of translocon assembly and regulation are also discussed.

Introduction

Type III secretion systems (T3SS) are complex macromolecular machineries employed by a number of bacteria to inject toxins and effectors directly into the cytoplasm of eukaryotic cells. Pathogens carrying this system, which include *Pseudomonas*, *Yersinia*, *Salmonella* and *Shigella* spp., as well as clinical *Escherichia coli* isolates, can translocate between four and 20 effectors with dramatic effects on the target cell, leading, for example, to cytoskeleton rearrangement, membrane disruption or the initiation of apoptosis [1–3].

T3SS are composed of at least twenty distinct proteins that assemble into three major parts. The basal body of the system, composed of two main ring-like structures, spans both the inner and outer bacterial

membranes (Fig. 1) [4–7]. This multi-protein structure is associated with an ATPase, which itself is membrane-associated and faces the bacterial cytoplasm, and is suggested to be involved in facilitating the entry of export substrates into the secretion system [8–10]. The basal body of the T3SS is also associated with a proteinaceous needle that extends outwards from the bacterial surface and is assumed to act as a conduit for effector secretion [6,11–13], although direct evidence for this concept is lacking. Because the internal diameter of the needle is relatively small (2.0–2.5 nm), effectors probably travel in unfolded/semi-unfolded states [11]. Synthesis and assembly of the T3SS itself are induced once the bacterium is physically associated

Abbreviations

EHEC, enterohaemorrhagic; EPEC, enteropathogenic; IFN, interferon; SPI, Salmonella pathogenicity island; T3SS, type III secretion system; TM, transmembrane; TPR, tetratricopeptide.

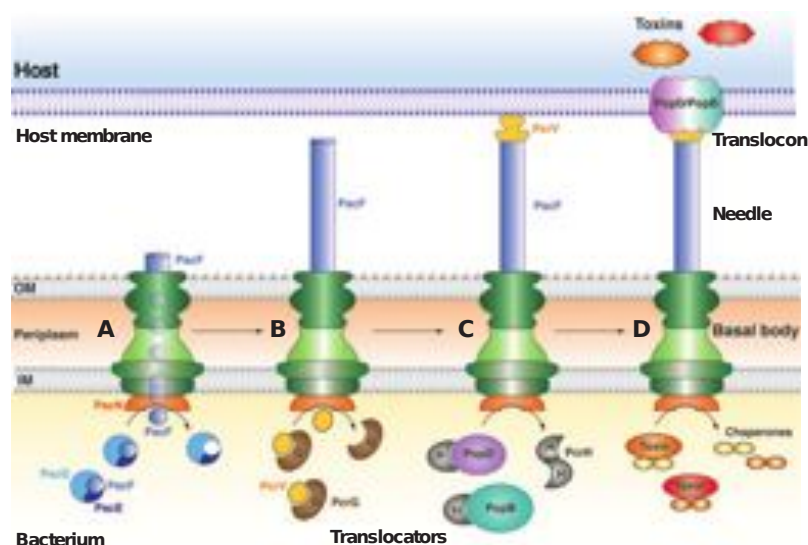


Fig. 1. Schematic diagram illustrating needle and translocon formation, as well as toxin secretion steps, in the T3SS of *P. aeruginosa* (a representative of the Ysc T3SS family). (A) Upon formation of the base rings (green), PscF is released from its chaperones (PscG and PscE) and polymerizes to form the T3SS needle. (B) The V antigen PcrV is released from its cytoplasmic partner (PscG) and forms the cap of the PscF needle. (C) Translocator proteins PopB and PopD release PcrH. (D) Upon formation of the Pop translocon on the eukaryotic membrane, toxins produced in the bacterial cytoplasm release their cognate chaperones and are injected through the translocon pore and into the target cytoplasm. IM, inner membrane; OM, outer membrane.

with an eukaryotic host cell membrane, although the nature of the cellular signal required and the mechanism of its transduction are still a matter of debate [14,15].

The third, major part of the T3SS is the 'translocon', which is generally composed of three proteins that are exported through the needle upon cell contact and form a pore on the surface of the eukaryotic cell that allows toxin entry into the target cytoplasm. Two T3SS loci-encoded membrane proteins (the hydrophobic translocators) and one hydrophilic partner (also called the V antigen in *Pseudomonas aeruginosa* and *Yersinia* spp.; Figs 1 and 2) comprise the translocon, and are essential for its formation in all systems studied to date. Genes that code for translocon members are encoded within the same operon, which also harbours elements that encode chaperones for both the V antigen and the hydrophobic translocators (i.e. all molecules required to form the translocon in the well-studied *Yersinia* system, for example, are encoded within the *lcrGVHyopBD* genetic element).

Translocon components are dispensable for secretion but are essential for the injection of type III effectors into the target cytoplasm and therefore are considered to be the first substrates secreted by the T3SS needle upon cell contact. In the absence of external secretion stimuli, all three translocon components remain

associated with their respective chaperones (Fig. 1) and are stored in the cytoplasm. However, upon cell contact, the entire cytoplasmic pool of translocator proteins is released rapidly and concurrently, and effectors are translocated in an ordered manner [16,17]. Translocon proteins presumably travel through the interior of the needle and, once having reached the outmost extremity of the conduit, all three components are assumed to associate to form the translocation pore. The precise order of passage of the individual translocator proteins to the outside of the system is unknown (for clarity, the hydrophilic partner is depicted in Fig. 1 as being the first molecule to be localized). Within the tripartite organization of the translocon, the hydrophilic translocator is the only component that is neither directly, nor indirectly associated with the target membrane; rather, it assembles into a distinct structure at the tip of the T3SS needle, and potentially plays the role of assembly platform for the two hydrophobic components [18–23]. The two others, which carry predicted hydrophobic domains, have been shown to be directly associated with target membranes and to exist both in oligomeric and monomeric forms [24–26]. In all systems studied to date, the largest of the hydrophobic translocators displays two predicted transmembrane (TM) regions (henceforth termed the major translocator; i.e. YopB in *Yersinia*

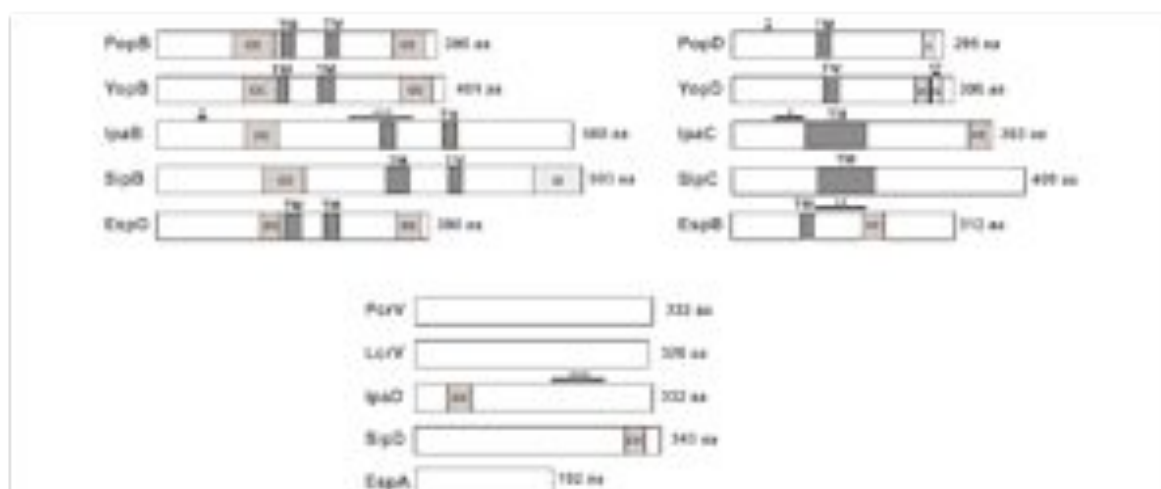


Fig. 2. Diagrammatic analysis of the translocator molecules of the Ysc, Ssa/Esc and Inv-Mxi-Spa systems. TM, predicted transmembrane region; CC, predicted coiled coil; *, chaperone interaction region; **, region predicted as interacting with the hydrophilic partner; ***, region predicted as interacting with the hydrophobic partner; α, predicted amphipathic helix. aa, amino acid.

spp., PopB in *P. aeruginosa*, IpaB in *Shigella* spp. and EspD in pathogenic *E. coli* spp.), whereas the smallest protein (i.e. the minor translocator; YopD, PopD, IpaC and EspB in the aforementioned organisms) carries a single predicted membrane-association region (Fig. 2).

Phylogenetic analyses have allowed the classification of T3SS into seven different families, where macromolecules that compose the base, needle and translocon display sequence similarities both at the genetic and locus organizational levels [1]. Thus, the Ysc T3SS of *Yersinia* spp. is related to those of *P. aeruginosa* and *Aeromonas* spp., whereas the Inv-Mxi-Spa systems are found in *Shigella*, *Salmonella*, and *Burkholderia* spp. In addition, Ssa-Esc systems exist in enteropathogenic (EPEC) and enterohaemorrhagic (EHEC) *Escherichia coli* species (Esc), and also represent the second T3S system [*Salmonella* pathogenicity island (SPI)-2] in intracellular *Salmonella* spp. (Ssa) [27]. However,

secreted toxins are pathogen-specific, and their different characteristics and cellular fates influence the distinct infectious phenotypes of the source microorganism [2]. In this review, only the translocators from the three aforementioned Ysc, Inv-Mxi-Spa and Ssa-Esc T3SS families will be discussed.

The hydrophobic translocators recognize a common chaperone

In the bacterial cytoplasm, the two hydrophobic translocators are associated with a common chaperone that shares a considerable sequence identity even within distant species. Recent efforts in the structural characterization of T3SS translocator chaperones have revealed that they adopt a seven-helical tetratricopeptide (TFR)-like repeat fold [28–30], which is known to be involved in protein-protein interactions (Fig. 3) [31]. Notably, this fold is also shared by chaperones that



Fig. 3. Chaperones of hydrophobic translocators display a TFR fold. SipD, PcrV and IpgC are shown in yellow, green and magenta, respectively. The peptides located within the concave regions of PcrV and IpgC, corresponding to sections of the N-termini of PopD and IpaB, are shown as surfaces.

stabilize the building blocks of the T3SS needle [32,33], suggesting that TPR folds could be specific for chaperones of 'early' T3SS substrates, such as translocon and needle-forming subunits, whereas other chaperone folds are employed for effector molecules [30,34]. TPR folds resemble a 'cupped hand', in which target proteins can be recognized either within the 'palm' region, the back of the hand, or both [32]. Notably, TPR chaperones that recognize translocon hydrophobic components have been shown to bind to the N-terminal sequences of both major and minor translocator proteins within the 'palm' regions, revealing that one single chaperone cannot recognize both translocators concomitantly [30]. It is of note that T3SS translocators display molten globule characteristics both in the presence and absence of their respective chaperones [35,36], which is to be expected for proteins that must modify their conformations to accomplish a number of steps essential for their functionality during T3SS toxin injection. These steps include detachment from their chaperone, partial unfolding to allow transport through a thin conduit and, finally, oligomerization in the presence of lipids (see below). This suggests that translocator molecules could be partially 'wrapped' around their cognate chaperones.

Effector/translocator-bound chaperones have also been proposed to interact with the membrane-associated ATPase located at the base of the T3SS (shown in orange in Fig. 1). The T3SS ATPase is similar to the F_1 ATPases [37] and associates into a hexameric ring, thus being highly reminiscent of the flagellar ATPase FliI [38,39]. The chaperone-ATPase interaction is suggested to be crucial for complex dissociation and substrate unfolding in preparation for transport through the needle [8]. In addition, the detection of complexes between T3SS ATPases and partner molecules, although challenging as a result of the potential transient nature of the interactions, has been reported for needle proteins [40] and a multi-cargo chaperone [41]. Interestingly, in *Salmonella*, a small cytoplasmic protein of the SPI-2 locus (SsaE) was shown to interact both with translocator protein SseB as well as with the T3SS ATPase, SsaN [42]. These findings suggest that there is a complex interplay of interactions between hydrophobic translocators, their cognate chaperones and the cytosol/membrane interface of the T3SS even before their passage through the T3SS needle.

The major hydrophobic translocator

Major hydrophobic translocators of *Shigella* (IpaB), *Salmonella* (SipB), *P. aeruginosa* (PopB), *Yersinia*

(YopB) and pathogenic *Escherichia* spp. (EspD) all carry two predicted TM regions, and are predicted to have a N-terminal coiled-coil region and, occasionally, a C-terminal amphipathic helix (Fig. 2). It is within the two TM regions and the intervening loop that major translocators display the highest level of sequence identity (Figs 2 and 3), demonstrating the functional importance of these regions in membrane association, pore formation and translocation [24, 43–46]. Notably, purified *Shigella* IpaB remains intimately associated with model membranes, being resistant to extraction with agents that solubilize superficially-associated proteins. In addition, limited proteolysis experiments of membrane-imbedded IpaB confirm that lipids protect the two TM regions, as well as the intervening sequence from trypsinization [44]. Interestingly, both *Shigella* IpaB and *Salmonella* SipB were shown to form SDS-resistant trimers through interactions that are formed within their N-terminal domains [44], although the bilayer-inserted form of SipB was shown to be hexameric [47].

Intimate association of the major hydrophobic translocator with target membranes was also shown by contact haemolysis experiments performed with *Shigella*, *P. aeruginosa* and EPEC, which revealed successful membrane insertion of IpaB, PopB and EspD, respectively, upon T3SS induction [19,44,48]. It is of note that PopB on its own associates rapidly with artificial membranes and promotes the efficient release of small fluorescent molecules from liposomes [49]. However, infectious *Pseudomonas* strains in which PopD is absent can still insert PopB into host membranes but the strain remains unable to translocate toxins [19], suggesting that the major hydrophobic translocator requires a minor translocator for functional translocon formation.

In some cases, major translocator proteins can show functional equivalency: DyopB *Yersinia* strains can be complemented by plasmids expressing the pcrGVHpopBD operon, whereas the opposite is also true for DpopB *Pseudomonas* strains complemented with plasmids expressing lcrGVHyopBD. Interestingly, complementation only occurs if the entire operon is expressed (and not just the single translocator), suggesting that other partner translocon molecules must also be present [50]. Conversely, IpaB is not able to complement either *Yersinia* or *Pseudomonas* mutant strain, suggesting that the bulkier *Shigella* protein lacks regions that are conserved in YopB and PopB. Notably, *Shigella* ipaB mutants can be complemented by a plasmid carrying *Salmonella* sipB, indicating that, with respect to the hydrophobic translocators of the Inv-Mxi-Spa system [51], proteins that display

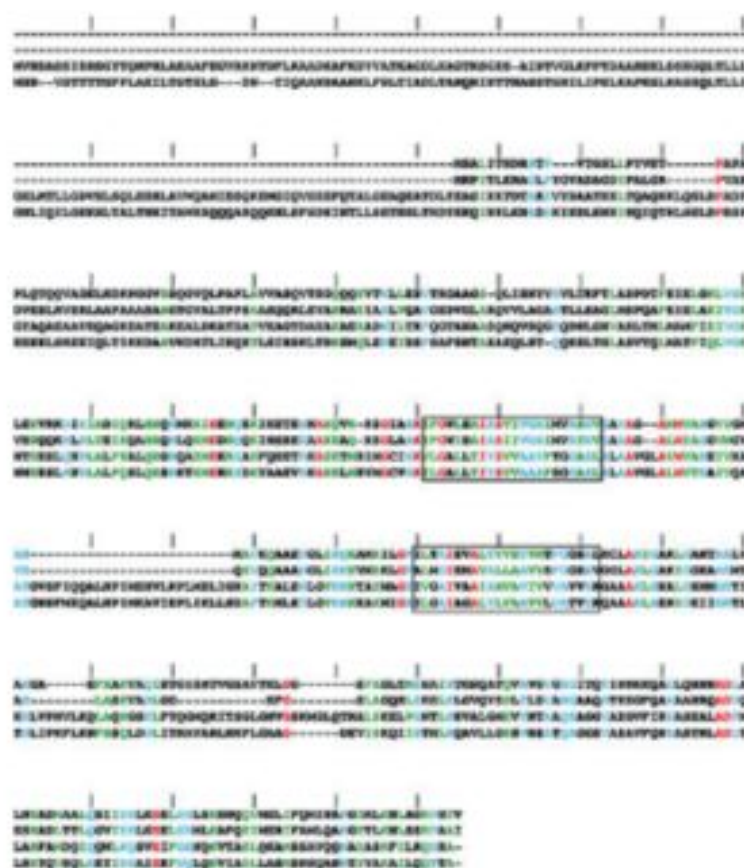


Fig. 4. Sequence alignments of major translocator proteins that display the highest level of sequence similarity. Identical residues are shown in red. Residues in green and blue display strong and weak similarity, respectively. The two predicted TM regions are indicated in boxes.

extensive sequence similarities (Fig. 4) also show comparable functional characteristics.

Recently, it was shown that the extreme C-terminus of IpaB binds to the T3SS needle, serving as a 'bridge' between the eukaryotic membrane and the *Shigella* secretion system. IpaB is required for regulating secretion, and may play the role of host cell sensor. It was proposed that the needle tip, which in principle contacts all three translocon components, exists in 'on' and 'off' states [52], thus suggesting that all proteins involved in the initial contact with the target cell may considerably modify their conformations or oligomerization states during the secretion process. This proposal is also supported by the suggestion that pH sensing by *Salmonella* involves modifications in the assembly of the translocon, which affect the pH gradient within the needle, sending signals to the base of the T3SS structure [53]. In addition, Shen et al. [54] identified that distinct IpaB regions (residues 227–236 and 297–306) are required for secretion regulation. Further clarifications of this complex process will thus require the structural

characterization of the translocon, potentially in different states of activation.

The minor hydrophobic translocator

This class of proteins has been studied more extensively, potentially because they carry a single predicted TM region (Fig. 2) and are thus more biochemically tractable. Minor translocators are well conserved amongst different bacterial species, displaying a considerable level of sequence identity levels (i.e. 38% for *Pseudomonas* PopD and *Yersinia* YopD; 29% for *Shigella* IpaC and *Salmonella* SipC). Indeed, sections of IpaC and SipC (as well as YopD and PopD) are interchangeable without affecting secretion [55,56]; in the latter case, however, the proteins can be exchanged only if the cognate chaperone and translocator partners are present [50]. As is the case for the major translocator, minor translocators have also been shown to oligomerize, and this event is essential not only for pore formation, but also for events that take place within the eukaryotic cytoplasm [26,57,58]. The two

translocators show clear differences in terms of membrane association, which is evident from the fact that PopD is less able to release fluorescent dyes from liposomes than PopB (although it readily binds to artificial membranes) [49], whereas a PcrV knockout mutant can successfully insert PopB but not PopD into red blood cell membranes [19]. In addition, in *Shigella*, IpaC is required for pore formation but not for membrane insertion of IpaB, suggesting that IpaB may be the first protein to be inserted in the bilayer, but without IpaC the pore cannot be functional [24].

So far, very limited structural data is available for any of the translocator molecules. It has been shown that EspB, IpaC and PopD all possess partly disordered structures, which could potentially be a requirement for chaperone release, secretion and the formation of more complex structures upon attaining the eukaryotic membrane [35,36,59]. Interestingly, Costa et al. [60] identified that the C-terminal, coiled coil amphipathic domain of YopD, whose structure was solved by NMR by Teng et al. [61], is essential for interacting with LcrV and forming oligomers but does not play a role in YopB recognition. These observations all point to the multifunctional aspect of the structures of the translocator proteins, which, in addition to recognizing chaperones and hydrophobic partners, must also interact with the T3SS needle to permit toxin translocation.

Minor translocators have been shown, in many pathogens, to play important roles in the cytoskeletal rearrangement processes that occur upon T3SS induction. *Salmonella* SipC carries two functions: participation in the formation of the membrane-inserted pore and acting as an actin nucleation initiator by promoting its own multimerization [57]. In addition, SipC has been shown to recruit the Exo70 exocyst component, thus facilitating fusion of exocytic vesicles with the plasma membrane and increasing *Salmonella* invasion efficiency [62]. It is of note that both IpaC and SipC are essential for *Shigella* and *Salmonella* uptake by macrophages in the early steps of invasion, and have the ability to induce membrane extensions (filopodia and lamellipodia) on macrophages [55,63]. Specifically, IpaC was shown to recruit and activate Src tyrosine kinase, which is required for actin polymerization, at specific sites of bacterial entry, in a process where its 63 carboxy-terminal residues play a key role [64]. Interestingly, EspB was shown to be essential for the development of attaching and effacing (A/E) lesions by EHEC by recruiting α -catenin, a cytoskeletal protein that recognizes actin, to the site of bacterial contact [65,66]. In addition, it is also involved in the inhibition of myosin function, leading to microvillus

effacement [67]. Although the precise sequence of events that leads to secretion of translocators is not well understood, it is of note that IpaC has been shown to localize to the bacterial pole regions upon T3SS induction in *Shigella*. This event may be of importance to locally target all T3SS effectors and efficiently affect cytoskeletal rearrangement processes [68].

Association between hydrophobic translocators and pore formation

Formation of the translocon potentially requires a direct association between the two hydrophobic translocators. This possibility has been investigated by assays ranging from pull-downs to genetic knockouts and microbiological tests. In *E. coli*, purified forms of EspB can recognize EspD found in bacterial lysates [69], whereas *Yersinia pseudotuberculosis* YopD recognizes both YopB and the V antigen (LcrV) in pull-down assays [61].

However, the structural characteristics of the membrane-inserted pore have remained elusive. Nevertheless, dye release studies have revealed that the pores formed by YopB/YopD and PopB/PopD have similar internal diameters, in the range 1.2–3.5 nm [70,71]. In addition, negative staining electron microscopy images of the PopB or PopD-associated liposomes structures have suggested an internal diameter of approximately 25 Å, with an external measurement of 80 Å [26]; atomic force microscopy studies on pores formed by EPEC indicate an approximate internal diameter of 2.0 nm [69], whereas the IpaB/IpaC *Shigella* pore has an inner radius of 26 ± 0.4 Å [24]. These measurements are in agreement with the internal diameter of the T3SS needle [72], which would facilitate toxin translocation into the host cytoplasm. However, the exact stoichiometry of the pore remains a matter of controversy. Ide et al. [69] suggested that the membrane-inserted structure is composed of six to eight subunits, which is in agreement with the studies on SipB from the *Salmonella* system [47], although the precise determination of pore stoichiometry in other species still awaits further study.

The hydrophilic translocator: the V antigen

The third component of the translocation apparatus is a hydrophilic protein: PcrV in *P. aeruginosa*, LcrV in *Yersinia* spp, IpaD in *Shigella* and SipD in *Salmonella* spp (Fig. 2). The LcrV protein of *Yersinia pestis* was discovered more than 50 years ago as a soluble protective antigen, and was thus termed the 'V antigen' [73].

Indeed, immunization with LcrV or PcrV elicits the production of antibodies that protect against *Yersinia* or *Pseudomonas* infections in animal models [74–76], and LcrV was included in the formulation of a vaccine against plague [77,78]. Although less studied, antibodies directed toward IpaD were also shown to partially protect erythrocytes and HeLa cells against *Shigella flexneri* infection [79,80]. Notably, in EPEC and EHEC, the EspA protein could play a similar role in translocon assembly, although it displays no sequence similarity and is structurally distinct from V antigens from *Yersinia* and *Pseudomonas*, forming a filamentous substructure at the extremity of the *E. coli* injectisome needle [81,82].

The hydrophilic translocators are multifunctional macromolecules that play roles in different processes such as regulation of secretion, host process hijacking and toxin translocation; this latter function appears to be the only one that is common to all bacteria. In *Yersinia*, the increased synthesis of LcrV triggered by the activation of the system leads to the titration of LcrG, which binds LcrV in a 1 : 1 complex. In turn, this results in a release of the secretion blockade mediated by LcrG [83,84]. Although PcrV from *P. aeruginosa* binds both to PcrG and LcrG, its participation in the regulation of secretion is still a matter of controversy [20,85–87]. In addition, LcrV directly affects the host innate immunity and inflammatory response, which is not the case for its counterparts in other bacteria. Its interaction with macrophages induces a decrease in the production of the pro-inflammatory cytokines tumour necrosis factor- α and interferon (IFN)- γ and an overproduction of interleukin-10, and it has also been shown to bind to soluble IFN- γ in a 1 : 1 complex in a manner that is independent of the IFN- γ receptor [88–91]; most notably, the N-terminal region of LcrV, which has been reported to recognize both TLR2 and CD14 receptors [90]. Furthermore, LcrV also inhibits the chemotactic migration of polymorphonuclear leukocytes [92]. Despite sharing significant amino acid conservation with LcrV, PcrV from *P. aeruginosa* does not display similar activities toward the host immune defence system [93]. This particular difference in function could be linked to an additional amino acid stretch present in LcrV (amino acids 41–59 in LcrV) [90] and may be related to the differences in virulent behaviours of the two pathogens.

The role of hydrophilic translocators in toxin translocation is closely linked to their localization during infection. IpaD and LcrV were shown to be present at the bacterial surface even before contact with the host cell [94–96]. In addition, the presence of LcrV and IpaD forming a higher ordered structure at the tip of

the secretion needle was elegantly documented by electron microscopy [21,79,80]. In *Shigella*, under conditions that favour infection, the hydrophobic translocators associate with IpaD at the needle tip and may sense host cell contact and subsequently transmit this information to the bacterial cytoplasm via the needle itself [15,23,52,97,98]. On the basis of the crystal structures of the soluble LcrV and IpaD molecules, which display dumbbell-like folds [23,99], the hydrophilic translocator was modelled as a pentamer on top of the secretion needle [13,23,99]. Indeed, *in vitro*, PcrV and LcrV are able to associate into multimers and to form hollow ring-like structures, with dimensions that are similar to those observed for PopB and PopD membrane-associated rings [26,100].

The critical function of the hydrophilic translocator resides in its participation in toxin translocation. Knockout mutants prevent the injection of effectors into the host cell without affecting their secretion [24,95,101–103]. However, although not required for pore formation *in vitro* [49,59,104], the hydrophilic translocator is essential for the proper insertion of its hydrophobic counterparts into the host cell membrane [18,19,22,105]. This is in agreement with findings suggesting that, despite LcrV and PcrV being fairly interchangeable, they display a significant specificity toward their respective hydrophobic translocators [50,102]. Finally, in agreement with the phenotypes associated with gene deletions, antibodies directed towards PcrV and LcrV hamper the insertion of the translocation pore into membranes as well as its functionality [105]. Thus, its position at the tip of the secretion needle and its importance in the formation of the translocon strongly suggests that the hydrophilic translocator could be considered as an assembly platform for the translocation pore [106].

These collective observations thus allow the proposition of two distinct models of translocon assembly. In the first model, both hydrophobic translocators exist in oligomeric form, with the major partner inserted stably into the membrane, whereas the minor protein is the link with the V antigen. In this model, which is in agreement with the biochemical results obtained for translocator proteins for most species studied to date, the minor translocator is only superficially attached to the membrane. The second, less likely model, involves a heterooligomer of both hydrophobic translocators, which themselves contact the V antigen. Although most evidence points to the first, ‘three-tiered ring’ model, the scarcity of information with respect to the mode of assembly of the three proteins suggests that it is still early to discard the possibility of the translocon being assembled as a heterooligomer.

Host membrane characteristics and response to pore formation

The composition of the host cell membrane appears to be a critical point for the invasion of bacteria, insertion of translocators and functionality of the pore. Target membrane cholesterol was shown to be essential for bacterial adherence, effector translocation, and pedestal formation by EPEC [107] and for T3SS-induced virulence in both *Salmonella* and *Shigella* [46,108,109]. Experiments performed *in vitro* confirmed that both hydrophobic translocators of *Pseudomonas* (PopB and PopD) could recognize cholesterol-free artificial bilayers; however, liposomes could only be lysed if cholesterol were present [26]. Notably, depletion of cholesterol from cellular membranes by beta-D cyclodextrin diminishes the translocation efficiency of the *Pseudomonas* T3SS (F. Cretin & I. Attree, unpublished data).

Shigella spp. employ their T3SS to induce apoptosis-like macrophage cell death through phagosome lysis and subsequent escape into the cytoplasm. This process requires the activation of caspase-1, which is specifically recognized by IpaB. Secreted IpaB associates not only with the host cell membrane [24], binding to the hyaluronan receptor CD44 on the cell surface [110], but also partitions to membrane rafts [111], which are rich in cholesterol and sphingolipids. Again, cholesterol is shown to be key for T3SS function because it is essential for IpaB binding and caspase-1 triggering [46]; notably, both IpaB and SipB bind cholesterol with high affinity [108]. Cholesterol is an ubiquitous component of all eukaryotic membranes, possibly explaining why T3SS can insert translocon into a large number of target bilayers.

Negatively-charged phospholipids have also been shown to be essential for translocation pore insertion both in a system where protein secretion by live bacteria was induced in the presence of lipids [104], as well as *in vitro*. Purified *Pseudomonas* proteins PopB and PopD preferentially recognize phosphatidylserine-containing liposomes, whereas positively-charged phospholipids such as phosphoethanolamine prevent introduction of the molecules on bilayers [26,49]. Of note, however, most lipid-related effects were observed for the hydrophobic components of the pore, with the exception of the *Shigella* system, in which deoxycholate and bile salts were reported as participating actively in recruiting IpaD, the V antigen ortholog, onto the needle tip, subsequently yielding the complete pore [98,112].

The innate immune response to elements of the T3SS is highly dependent on translocon formation. Recently, Auerbuch et al. [113] described the induction

of inflammatory cytokines (nuclear factor κ B and type I interferon) in response to a strain of *Y. pseudotuberculosis* expressing a functional translocation pore but not after the introduction of T3SS toxins into the cells independently of pore formation. These results suggest that, in addition to cytosolic immune sensors that recognize microbial molecules such as peptidoglycan [114], eukaryotic cells may also harbour other sensors recognizing T3SS signals that also affect the immune response [113]. Interestingly, pH modification was reported to play a key role in effector translocation and pore formation by the SPI-2 T3SS of *Salmonella* [53]. Finally, modifications in host cell polarity, adhesion and the presence of major eukaryotic signalling molecules (such as Rac and Rho) at the site of translocon assembly on the eukaryotic membrane may influence pore functionality [115,116]. However, direct confirmation of the existence of interactions between translocators and host cell macromolecules is still lacking.

Conclusions

Despite the large amount of existing data regarding the characterization of T3SS translocon components of different bacterial species, many questions remain to be elucidated with respect to the stoichiometry of pore formation, membrane targeting and the potential role that the translocon can play in the regulation of secretion. In addition, little structural information regarding the hydrophobic components of the translocon is available. Novel technologies, such as the employment of lipid nanodiscs [117] or lipidic cubic phase crystallization systems [118], both of which allow target proteins to be stabilized within model bilayer systems, could promote the formation of homogeneous, lipid-embedded samples. In addition, new methodologies that combine the use of cryo-electron tomography and 3D image averaging, and which allow the structural characterization of membrane proteins within their cellular environment [119], could potentially be employed for the structural study of the T3SS translocation pore within the eukaryotic membrane. Given the importance of T3SS in the infection and invasion processes of a number of bacteria, these studies will likely provide crucial information regarding key details of this complex machinery.

Acknowledgements

Work in the Dessen and Attree groups is supported by grants from the French Cystic Fibrosis Foundation (Vaincre la Mucoviscidose; VLM) and the Direction

des Sciences du Vivant (DSV), CEA. P.J.M. was supported by a PhD fellowship from the Rhône-Alpes region and T.I. was supported by a PhD fellowship from the VLM.

References

- Cornelis GR (2006) The type III secretion injectisome. *Nat Rev Microbiol* 4, 811–825.
- Galán JE (2009) Common themes in the design and function of bacterial effectors. *Cell Host Microbe* 5, 571–579.
- Marlovits TC & Stebbins CE (2009) Type III secretion systems shape up as they ship out. *Curr Opin Microbiol* 13, 1–6.
- Hodgkinson JL, Horsley A, Stabat D, Simon M, Johnson S, da Fonseca PCA, Morris EP, Wall JS, Lea SM & Blocker AJ (2009) Three-dimensional reconstruction of the *Shigella* T3SS transmembrane regions reveals 12-fold symmetry and novel features throughout. *Nat Struct Mol Biol* 5, 477–485.
- Moraes TF, Spreter T & Strynadka NCJ (2008) Piecing together the type III injectisome of bacterial pathogens. *Curr Opin Struct Biol* 18, 258–266.
- Schraidt O, Lefebvre MD, Brunner MJ, Schmied WH, Schmidt A, Radics J, Mechtler K, Galán JE & Marlovits TC (2010) Topology and organization of the *Salmonella typhimurium* type III secretion needle complex components. *PLoS Pathog* 6, e1000824.
- Spreter T, Yip CK, Sanowar S, Andrei I, Kimbrough TG, Vuckovic M, Pfuetzner RA, Deng W, Yu AC, Finlay BB et al. (2009) A conserved structural motif mediates formation of the periplasmic rings in the type III secretion system. *Nat Struct Mol Biol* 5, 468–476.
- Akeda Y & Galán JE (2005) Chaperone release and unfolding of substrates in type III secretion. *Nature* 437, 911–915.
- Paul K, Erhardt M, Hirano T, Blair DF & Hughes KT (2008) Energy source of flagellar type III secretion. *Nature* 451, 489–493.
- Minamino T & Namba K (2008) Distinct roles of the FliI ATPase and proton motive force in bacterial flagellar protein export. *Nature* 451, 485–489.
- Blocker A, Jouihi N, Larquet E, Gounon P, Ebel F, Parsot C, Sansonetti P & Allaoui A (2001) Structure and composition of the *Shigella flexneri* 'needle complex', a part of its type III secretion. *Mol Microbiol* 39, 652–663.
- Marlovits TC, Kubori T, Lara-Tejero M, Thomas D, Unger VM & Galán JE (2006) Assembly of the inner rod determines needle length in the type III secretion injectisome. *Nature* 441, 637–640.
- Deane JE, Roversi P, Cordes FS, Johnson S, Kenjale R, Daniel S, Booy F, Picking WD, Picking WL, Blocker AJ et al. (2006) Molecular model of a type III secretion needle: implications for host-cell sensing. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 12529–12533.
- Dasgupta N, Ashare A, Hunninghake GW & Yahr TL (2006) Transcriptional induction of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system by low Ca^{2+} and host cell contact proceeds through two distinct signaling pathways. *Infect Immun* 74, 3334–3341.
- Veenendaal AK, Hodgkinson JL, Schwarzer L, Stabat D, Zenk SF & Blocker AJ (2007) The type III secretion system needle tip complex mediates host cell sensing and translocon insertion. *Mol Microbiol* 63, 1719–1730.
- Enninga J, Mounier J, Sansonetti P & Tran van Nhieu G (2005) Secretion of type III effectors into host cells in real time. *Nat Methods* 2, 959–965.
- Mills E, Baruch K, Charpentier X, Kobi S & Rosenshine I (2008) Real-time analysis of effector translocation by the type III secretion system of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Cell Host Microbe* 3, 104–113.
- Broz P, Mueller CA, Muller SA, Philippson A, Sorg I, Engel A & Cornelis GR (2007) Function and molecular architecture of the *Yersinia* injectisome tip complex. *Mol Microbiol* 65, 1311–1320.
- Goure J, Pastor A, Faudry E, Chabert J, Dessen A & Attree I (2004) The V antigen of *Pseudomonas aeruginosa* is required for assembly of the functional PopB/PopD translocation pore in host cell membranes. *Infect Immun* 72, 4741–4750.
- Lee P-C, Stopford CM, Svenson AG & Rietsch A (2010) Control of effector export by the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion proteins PcrG and PcrV. *Mol Microbiol* 75, 924–941.
- Mueller CA, Broz P, Muller SA, Ringler P, Erne-Brand F, Sorg I, Kuhn M, Engel A & Cornelis GR (2005) The V-antigen of *Yersinia* forms a distinct structure at the tip of injectisome needles. *Science* 310, 674–676.
- Picking WL, Nishioka H, Hearn PD, Baxter MA, Harrington AT, Blocker A & Picking WD (2005) IpaD of *Shigella flexneri* is independently required for regulation of Ipa protein secretion and efficient insertion of IpaB and IpaC into host membranes. *Infect Immun* 73, 1432–1440.
- Johnson S, Roversi P, Espina M, Olive A, Deane JE, Birket S, Field T, Picking WD, Blocker AJ, Galyov EE et al. (2007) Self-chaperoning of the type III secretion system needle tip proteins IpaD and BipD. *J Biol Chem* 282, 4035–4044.
- Blocker A, Gounon P, Larquet E, Niebuhr K, Cabioux V, Parsot C & Sansonetti P (1999) The tripartite type III secretion of *Shigella flexneri* inserts IpaB and IpaC into host membranes. *J Cell Biol* 147, 683–693.

- 25 Hakansson S, Schesser K, Persson C, Gaylov EE, Rosqvist R, Hombler F & Wolf-Watz H (1996) The YopB protein of *Yersinia pseudotuberculosis* is essential for the translocation of Yop effector proteins across the target cell plasma membrane and displays a contact-dependent membrane disrupting activity. *EMBO J* 15, 5812–5823.
- 26 Schoehn G, Di Guilmi AM, Lemaire D, Attree I, Weissenhorn W & Dessen A (2003) Oligomerization of type III secretion proteins PopB and PopD precedes pore formation in *Pseudomonas*. *EMBO J* 22, 4957–4967.
- 27 Troisfontaines P & Cornelis GR (2005) Type III secretion: more systems than you think. *Physiology* 20, 326–339.
- 28 Büttner CR, Sorg I, Cornelis GR, Heinz DW & Niemann HH (2008) Structure of the *Yersinia enterocolitica* type III secretion translocator chaperone SycD. *J Mol Biol* 375, 997–1012.
- 29 Lunelli M, Lokareddy RK, Zychlinsky A & Kolbe M (2009) IpaB-IpgC interaction defines binding motif for type III secretion translocator. *Proc Natl Acad Sci USA* 106, 9661–9666.
- 30 Job V, Mattei P-J, Lemaire D, Attree I & Dessen A (2010) Structural basis of chaperone recognition by type III secretion system minor translocator proteins. *J Biol Chem* 285, 23224–23232.
- 31 D'Andrea LD & Regan L (2003) TPR proteins: the versatile helix. *Trends Biochem Sci* 28, 655–662.
- 32 Quinaud M, Ple S, Job V, Contreras-Martel C, Simorre J-P, Attree I & Dessen A (2007) Structure of the heterotrimeric complex that regulates type III secretion needle formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 7803–7808.
- 33 Sun P, Tropea JE, Austin BP, Cherry S & Waugh DS (2008) Structural characterization of the *Yersinia pseudotuberculosis* type III secretion system needle protein YscF in complex with its heterodimeric chaperone YscE/YscG. *J Mol Biol* 377, 819–830.
- 34 Plé S, Job V, Dessen A & Attree I (2010) Co-chaperone interactions in export of the type III needle component PscF of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 192, 3801–3808.
- 35 Faudry E, Job V, Dessen A, Attree I & Forge V (2007) Type III secretion system translocator has a molten globule conformation both in its free and chaperone-bound forms. *FEBS J* 274, 3601–3610.
- 36 Hamada D, Kato T, Ikegami T, Suzuki KN, Hayashi M, Murooka Y, Honda T & Yanagihara I (2005) EspB from enterohaemorrhagic *Escherichia coli* is a natively partially folded protein. *FEBS J* 272, 756–768.
- 37 Zarivach R, Vuckovic M, Deng W, Finlay BB & Strynadka NC (2007) Structural analysis of a prototypical ATPase from the type III secretion system. *Nat Struct Mol Biol* 14, 131–137.
- 38 Imada K, Minamino T, Tahara A & Namba K (2007) Structural similarity between the flagellar type III ATPase FliI and Fli-ATPase subunits. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 485–490.
- 39 Muller SA, Pozidis C, Stone R, Meesters C, Chami M, Engel A, Economou A & Stahlberg H (2006) Double hexameric ring assembly of the type III protein translocase ATPase HrcN. *Mol Microbiol* 61, 119–125.
- 40 Davis AJ, de Jesus Diaz DA & Mecsas J (2010) A dominant-negative needle mutant blocks type III secretion of early but not late substrates in *Yersinia*. *Mol Microbiol* 76, 236–259.
- 41 Cooper CA, Zhang K, Andres SN, Fang Y, Kaniuk NA, Hannemann M, Brumell JH, Foster LJ, Junop MS & Coombes BK (2010) Structural and biochemical characterization of SrcA, a multi-cargo type III secretion chaperone in *Salmonella* required for pathogenic association with a host. *PLoS Pathog* 6, e1000751.
- 42 Miki T, Shibagaki Y, Danbara H & Okada N (2010) Functional characterization of SsaE, a novel chaperone protein of the type III secretion system encoded by *Salmonella* pathogenicity island 2. *J Bacteriol* 191, 6843–6854.
- 43 McGhie EJ, Hume PJ, Hayward RD, Torres J & Koronakis V (2002) Topology of the *Salmonella* invasion protein SipB in a model bilayer. *Mol Microbiol* 44, 1309–1321.
- 44 Hume PJ, McGhie EJ, Hayward RD & Koronakis V (2003) The purified *Shigella* IpaB and *Salmonella* SipB translocators share biochemical properties and membrane topology. *Mol Microbiol* 49, 425–439.
- 45 Ryndak MB, Chung H, London E & Bliska JB (2005) Role of predicted transmembrane domains for type III translocation, pore formation, and signaling by the *Yersinia pseudotuberculosis* YopB protein. *Infect Immun* 73, 2433–2443.
- 46 Schroeder GN & Hilbi H (2007) Cholesterol is required to trigger caspase-1 activation and macrophage apoptosis after phagosomal escape of *Shigella*. *Cell Microbiol* 9, 265–278.
- 47 Hayward RD, McGhie EJ & Koronakis V (2000) Membrane fusion activity of purified SipB, a *Salmonella* surface protein essential for mammalian cell invasion. *Mol Microbiol* 37, 727–739.
- 48 Shaw RK, Daniel S, Ebel F, Frankel G & Knutton S (2001) EspA filament-mediated protein translocation into red blood cells. *Cell Microbiol* 3, 213–222.
- 49 Faudry E, Vernier G, Neumann E, Forge V & Attree I (2006) Synergistic pore formation by type III toxin translocators of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry* 45, 8117–8123.
- 50 Bröms JE, Sundin C, Francis MS & Forsberg A (2003) Comparative analysis of type III effector translocation by *Yersinia pseudotuberculosis* expressing

- native LcrV or PcrV from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Infect Dis* 188, 239–249.
- 51 Hermant D, Méhard R, Arricau N, Parsot C & Popoff MY (1995) Functional conservation of the *Salmonella* and *Shigella* effectors of entry into epithelial cells. *Mol Microbiol* 17, 781–789.
- 52 Roehrich AD, Martinez-Argudo I, Johnson S, Blocker AJ & Veenendaal AK (2010) The extreme C terminus of *Shigella flexneri* IpaB is required for regulation of type III secretion, needle tip composition, and binding. *Infect Immun* 78, 1682–1691.
- 53 Yu X-J, McGourty K, Liu M, Unsworth KE & Holden DW (2010) pH sensing by intracellular *Salmonella* induces effector translocation. *Science* 328, 1040–1043.
- 54 Shen DK, Saurya S, Wagner C, Nishioka H & Blocker AJ (2010) Domains of the *Shigella flexneri* T3SS IpaB protein involved in secretion regulation. *Infect Immun* 78, 4999–5010.
- 55 Osiecki JC, Barker J, Picking WL, Serfis AB, Berring E, Shah S, Harrington A & Picking WD (2001) IpaC from *Shigella* and SipC from *Salmonella* possess similar biochemical properties but are functionally distinct. *Mol Microbiol* 42, 469–481.
- 56 Harrington AT, Hearn PD, Picking WL, Barker JR, Wessel A & Picking WD (2003) Structural characterization of the N-terminus of IpaC from *Shigella flexneri*. *Infect Immun* 71, 1255–1264.
- 57 Chang J, Myeni SK, Lin TL, Wu CC, Staiger CJ & Zhou D (2007) SipC multimerization promotes actin nucleation and contributes to *Salmonella*-induced inflammation. *Mol Microbiol* 66, 1548–1556.
- 58 Picking WL, Coye L, Osiecki JC, Serfis AB, Schaper E & Picking WD (2001) Identification of functional regions within invasion plasmid antigen C (IpaC) of *Shigella flexneri*. *Mol Microbiol* 39, 100–111.
- 59 Kuetzo LA, Osiecki J, Barker J, Picking WL, Ersoy B, Picking WD & Middaugh CR (2003) Structure-function analysis of invasion plasmid antigen C (IpaC) from *Shigella flexneri*. *J Biol Chem* 278, 2792–2798.
- 60 Costa TRD, Edqvist PJ, Bröms JE, Ahlund MK, Forsberg A & Francis MS (2010) YopD self-assembly and binding to LcrV facilitate type III secretion activity by *Yersinia pseudotuberculosis*. *J Biol Chem* 285, 25269–25284.
- 61 Tengel T, Sethson I & Francis MS (2002) Conformational analysis by CD and NMR spectroscopy of a peptide encompassing the amphipathic domain of YopD from *Yersinia*. *Eur J Biochem* 269, 3659–3668.
- 62 Nichols CD & Casanova JE (2010) *Salmonella*-directed recruitment of new membrane to invasion foci via the host exocyst complex. *Curr Biol* 20, 1316–1320.
- 63 Kuwae A, Yoshida S, Tamano K, Mimuro H, Suzuki T & Sasakawa C (2001) *Shigella* invasion of macrophage requires the insertion of IpaC into the host plasma membrane. *J Biol Chem* 276, 32230–32239.
- 64 Mounier J, Popoff MR, Enninga J, Frame MC, Sansonetti PJ & Tran Van Nhieu G (2009) The IpaC carboxyterminal effector domain mediates Src-dependent actin polymerization during *Shigella* invasion of epithelial cells. *PLoS Pathog* 5, e1000271.
- 65 Kodama T, Akeda Y, Kono G, Takahashi A, Imura K, Iida T & Honda T (2002) The EspB protein of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* interacts directly with α -catenin. *Cell Microbiol* 4, 213–222.
- 66 Hamaguchi M, Hamada D, Suzuki KN, Sakata I & Yanagihara I (2008) Molecular basis of actin reorganization promoted by binding of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* EspB to α -catenin. *FEBS J* 275, 6260–6267.
- 67 Iizumi Y, Sagara H, Kabe Y, Azuma M, Kume K, Ogawa M, Nagai T, Gillespie PG, Sasakawa C & Handa H (2007) The enteropathogenic *E. coli* effector EspB facilitates microvillus effacing and antiphagocytosis by inhibiting myosin function. *Cell Host Microbe* 2, 383–392.
- 68 Jamouill  V, Franc  tic O, Sansonetti PJ & Tran Van Nhieu G (2008) Cytoplasmic targeting of IpaC to the bacterial pole directs polar type III secretion in *Shigella*. *EMBO J* 27, 447–457.
- 69 Ide T, Laarman S, Greune L, Schillers H, Oberleithner H & Schmidt MA (2001) Characterization of translocation pores inserted into plasma membranes by type III-secreted Esp proteins of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Cell Microbiol* 3, 669–679.
- 70 Neyt C & Cornelis GR (1999) Insertion of a Yop translocation pore into the macrophage plasma membrane by *Yersinia enterocolitica*: requirement for translocators YopB and YopD, but not LcrG. *Mol Microbiol* 33, 971–981.
- 71 Dacheux D, Goure J, Chabert J, Usson Y & Attree I (2001) Pore-forming activity of type III system-secreted proteins leads to oncosis of *Pseudomonas aeruginosa*-infected macrophages. *Mol Microbiol* 40, 76–85.
- 72 Cordes FS, Komoriya K, Larquet E, Yang S, Egelman EH, Blocker A & Lea SM (2003) Helical structure of the needle of the type III secretion system of *Shigella flexneri*. *J Biol Chem* 278, 17103–17107.
- 73 Bacon GA & Burrows TW (1956) The basis of virulence in *Pasteurella pestis*: an antigen determining virulence. *Br J Exp Pathol* 37, 481–493.
- 74 Anderson GW Jr, Leary SE, Williamson ED, Titball RW, Welkos SL, Worsham PL & Friedlander AM (1996) Recombinant V antigen protects mice against pneumonic and bubonic plague caused by F1-capsule-positive and -negative strains of *Yersinia pestis*. *Infect Immun* 64, 4580–4585.
- 75 Sawa T, Yahr TL, Ohara M, Kurahashi K, Gropper MA, Wiener-Kronish JP & Frank DW (1999) Active and passive immunization with the *Pseudomonas*

- V antigen protects against type III intoxication and lung injury. *Nat Med* 5, 392–398.
- 76 Une T & Brubaker RR (1984) Roles of V antigen in promoting virulence and immunity in yersiniae. *J Immunol* 133, 2226–2230.
- 77 Wang S, Helman D, Liu F, Giehl T, Joshi S, Huang X, Chou TH, Goguen J & Lu S (2004) A DNA vaccine producing LcrV antigen in oligomers is effective in protecting mice from lethal mucosal challenge of plague. *Vaccine* 22, 3348–3357.
- 78 DeBord KL, Anderson DM, Marketon MM, Overheim KA, DePaolo RW, Ciletti NA, Jabri B & Schneewind O (2006) Immunogenicity and protective immunity against bubonic plague and pneumonic plague by immunization of mice with the recombinant V10 antigen, a variant of LcrV. *Infect Immun* 74, 4910–4914.
- 79 Espina M, Olive AJ, Kenjale R, Moore DS, Ausar SF, Kaminski RW, Oaks EV, Middaugh CR, Picking WD & Picking WL (2006) IpaD localizes to the tip of the type III secretion needle of *Shigella flexneri*. *Infect Immun* 74, 4391–4400.
- 80 Sani M, Botteaux A, Parsot C, Sansonetti P, Boekema EJ & Allaoui A (2007) IpaD is localized at the tip of the *Shigella flexneri* type III secretion apparatus. *Biochim Biophys Acta* 1770, 307–311.
- 81 Knutton S, Rosenshine I, Pallen MJ, Nisan I, Neves BC, Bain C, Wolff C, Dougan G & Frankel G (1998) A novel EspA-associated surface organelle of enteropathogenic *Escherichia coli* involved in protein translocation into epithelial cells. *EMBO J* 17, 2166–2176.
- 82 Yip CK, Finlay BB & Strynadka NC (2005) Structural characterization of a type III secretion system filament protein in complex with its chaperone. *Nat Struct Mol Biol* 12, 75–81.
- 83 Matson JS & Nilles ML (2001) LcrG-LcrV interaction is required for control of Yops secretion in *Yersinia pestis*. *J Bacteriol* 183, 5082–5091.
- 84 Matson JS & Nilles ML (2002) Interaction of the *Yersinia pestis* type III regulatory proteins LcrG and LcrV occurs at a hydrophobic interface. *BMC Microbiol* 2, 16.
- 85 Allmond LR, Karaca TJ, Nguyen VN, Nguyen T, Wiener-Kronish JP & Sawa T (2003) Protein binding between PcrG-PcrV and PcrH-PopB/PopD encoded by the pcrGVH-popBD operon of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system. *Infect Immun* 71, 2230–2233.
- 86 Sundin C, Thelaus J, Broms JE & Forsberg A (2004) Polarisation of type III translocation by *Pseudomonas aeruginosa* requires PcrG, PcrV and PopN. *Microb Pathog* 37, 313–322.
- 87 Nanao M, Ricard-Blum S, Di Guilmi AM, Lemaire D, Lascoux D, Chabert J, Attree I & Dessen A (2003) Type III secretion proteins PcrV and PcrG from *Pseudomonas aeruginosa* form a 1 : 1 complex through high affinity interactions. *BMC Microbiol* 3, 21.
- 88 Nakajima R & Brubaker RR (1993) Association between virulence of *Yersinia pestis* and suppression of gamma interferon and tumor necrosis factor alpha. *Infect Immun* 61, 23–31.
- 89 Nedialkov YA, Motin VL & Brubaker RR (1997) Resistance to lipopolysaccharide mediated by the *Yersinia pestis* V antigen-polyhistidine fusion peptide: amplification of interleukin-10. *Infect Immun* 65, 1196–1203.
- 90 Sing A, Rost D, Tvardovskaia N, Roggenkamp A, Wiedemann A, Kirschning CJ, Aepfelbacher M & Heesemann J (2002) *Yersinia* V-antigen exploits toll-like receptor 2 and CD14 for interleukin 10-mediated immunosuppression. *J Exp Med* 196, 1017–1024.
- 91 Gendrin C, Sarrazin S, Bonnaffé D, Jault J-M, Lortat-Jacob H & Dessen A (2010) Hijacking of the pleiotropic cytokine interferon- γ by the type III secretion system of *Yersinia pestis*. *PLoS ONE* 5, e15242.
- 92 Welkos S, Friedlander A, McDowell D, Weeks J & Tobery S (1998) V antigen of *Yersinia pestis* inhibits neutrophil chemotaxis. *Microb Pathog* 24, 185–196.
- 93 Sing A, Roggenkamp A, Geiger AM & Heesemann J (2002) *Yersinia enterocolitica* evasion of the host innate immune response by V antigen-induced IL-10 production of macrophages is abrogated in IL-10-deficient mice. *J Immunol* 168, 1315–1321.
- 94 Ménard R, Sansonetti P, Parsot C & Vasselon T (1994) Extracellular association and cytoplasmic partitioning of the IpaB and IpaC invasins of *S. flexneri*. *Cell* 79, 515–525.
- 95 Pettersson J, Holmstrom A, Hill J, Leary S, Frithz-Lindsten E, von Euler-Matell A, Carlsson E, Titball R, Forsberg A & Wolf-Watz H (1999) The V-antigen of *Yersinia* is surface exposed before target cell contact and involved in virulence protein translocation. *Mol Microbiol* 32, 961–976.
- 96 Watarai M, Tobe T, Yoshikawa M & Sasakawa C (1995) Disulfide oxidoreductase activity of *Shigella flexneri* is required for release of Ipa proteins and invasion of epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 4927–4931.
- 97 West NP, Sansonetti P, Mounier J, Exley RM, Parsot C, Guadagnini S, Prevost MC, Prochnicka-Chaloufour A, Delapierre M, Tanguy M et al. (2005) Optimization of virulence functions through glucosylation of *Shigella* LPS. *Science* 307, 1313–1317.
- 98 Olive AJ, Kenjale R, Espina M, Moore DS, Picking WL & Picking WD (2007) Bile salts stimulate recruitment of IpaB to the *Shigella flexneri* surface, where it colocalizes with IpaD at the tip of the type III secretion needle. *Infect Immun* 75, 2626–2629.
- 99 Derewenda U, Mateja A, Devedjiev Y, Routzahn KM, Evdokimov AG, Derewenda ZS & Waugh DS (2004)

- The structure of *Yersinia pestis* V-antigen, an essential virulence factor and mediator of immunity against plague. *Structure* 12, 301–306.
- 100 Gebus C, Faudry E, Bohn YS, Elsen S & Attree I (2008) Oligomerization of PcrV and LcrV, protective antigens of *Pseudomonas aeruginosa* and *Yersinia pestis*. *J Biol Chem* 283, 23940–23949.
- 101 Chen LM, Kaniga K & Galan JE (1996) *Salmonella* spp. are cytotoxic for cultured macrophages. *Mol Microbiol* 21, 1101–1105.
- 102 Holmstrom A, Olsson J, Cherepanov P, Maier E, Nordfelth R, Pettersson J, Benz R, Wolf-Watz H & Forsberg A (2001) LcrV is a channel size-determining component of the Yop effector translocon of *Yersinia*. *Mol Microbiol* 39, 620–632.
- 103 Lee VT, Tam C & Schneewind O (2000) LcrV, a substrate for *Yersinia enterocolitica* type III secretion, is required for toxin targeting into the cytosol of HeLa cells. *J Biol Chem* 275, 36869–36875.
- 104 de Geyter C, Wattiez R, Sansonetti P, Falmagne P, Ruyschaert JM, Parsot C & Cabiaux V (2000) Characterization of the interaction of IpaB and IpaD, proteins required for entry of *Shigella flexneri* into epithelial cells, with a lipid membrane. *Eur J Biochem* 267, 5769–5776.
- 105 Goure J, Broz P, Attree O, Cornelis GR & Attree I (2005) Protective anti-V antibodies inhibit *Pseudomonas* and *Yersinia* translocon assembly within host membranes. *J Infect Dis* 192, 218–225.
- 106 Mueller CA, Broz P & Cornelis GR (2008) The type III secretion system tip complex and translocon. *Mol Microbiol* 68, 1085–1095.
- 107 Allen-Vercoe E, Waddell B, Livingstone S, Deans J & DeVinney R (2006) Enteropathogenic *Escherichia coli* Tir translocation and pedestal formation requires membrane cholesterol in the absence of bundle-forming pili. *Cell Microbiol* 8, 613–624.
- 108 Hayward RD, Cain RJ, McGhie EJ, Phillips N, Garner MJ & Koronakis V (2005) Cholesterol binding by the bacterial type III translocon is essential for virulence effector delivery into mammalian cells. *Mol Microbiol* 56, 590–603.
- 109 van der Goot FG, Tran van Nhieu G, Allaoui A, Sansonetti P & Lafont F (2004) Rafts can trigger contact-mediated secretion of bacterial effectors via a lipid-based mechanism. *J Biol Chem* 279, 47792–47798.
- 110 Skoudy A, Mounier J, Aruffo A, Ohayon H, Gounon P, Sansonetti P & Tran van Nhieu G (2000) CD44 binds to the *Shigella* IpaB protein and participates in bacterial invasion of epithelial cells. *Cell Microbiol* 2, 19–33.
- 111 Lafont F, Tran van Nhieu G, Hanada K, Sansonetti P & van der Goot FG (2002) Initial steps of *Shigella* infection depend on the cholesterol/sphingolipid raft-mediated CD44-IpaB interaction. *EMBO J* 21, 4449–4457.
- 112 Stenrud KF, Adam PR, La Mar CD, Olive AJ, Lushington GH, Sudharsan R, Shelton NL, Givens RS, Picking WL & Picking WD (2008) Deoxycholate interacts with IpaD of *Shigella flexneri* in inducing the recruitment of IpaB to the type III secretion apparatus needle tip. *J Biol Chem* 283, 18646–18654.
- 113 Auerbuch V, Golenbock DT & Isberg RR (2009) Innate immune recognition of *Yersinia pseudotuberculosis* type III secretion. *PLoS Pathog* 5, e1000686.
- 114 Akira S, Uematsu S & Takeuchi O (2006) Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124, 783–801.
- 115 Viboud GI & Bliska JB (2001) A bacterial type III secretion system inhibits actin polymerization to prevent pore formation in host cell membranes. *EMBO J* 20, 5373–5382.
- 116 Bridge DR, Novotny MJ, Moore ER & Olson JC (2010) Role of host cell polarity and leading edge properties in *Pseudomonas* type III secretion. *Microbiology* 156, 356–373.
- 117 Katayama H, Wang J, Tama F, Chollet L, Gogol EP, Collier RJ & Fisher MT (2010) Three-dimensional structure of the anthrax toxin pore inserted into lipid nanodiscs and lipid vesicles. *Proc Natl Acad Sci USA* 107, 3453–3457.
- 118 Johansson LC, Wöhri AB, Katona G, Engström S & Neutze R (2009) Membrane protein crystallization from lipidic phases. *Curr Opin Struct Biol* 19, 372–378.
- 119 Bartesaghi A & Subramaniam S (2009) Membrane protein structure determination using cryo-electron tomography and 3D image averaging. *Curr Opin Struct Biol* 19, 402–407.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

Adams PD, Afonine PV, Bunkoczi G *et al.*, (2010), PHENIX : a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Cryst D*, 66 : 213-221.

Aguiar SI, Serrano I, Pinto FR, Melo-Cristino J, Ramirez M. (2008) The presence of the pilus locus is a clonal property among pneumococcal invasive isolates. *BMC Microbiol.*;8:41.

Akeda Y, Galán JE. (2004) Genetic analysis of the *Salmonella enterica* type III secretion-associated ATPase InvC defines discrete functional domains. *J Bacteriol.* 186(8):2402-12.

Akeda Y, Galán JE. (2005) Chaperone release and unfolding of substrates in type III secretion. *Nature*. 437(7060):911-5.

Allaoui A, Scheen R, Lambert de Rouvroit C, Cornelis GR. (1995) VirG, a *Yersinia enterocolitica* lipoprotein involved in Ca²⁺ dependency, is related to exsB of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* Aug ; 177(15) :4230-7

Attali C, Frolet C, Durmort C, Offant J, Vernet T, Di Guilmi AM. (2008) *Streptococcus pneumoniae* choline-binding protein E interaction with plasminogen/plasmin stimulates migration across the extracellular matrix. *Infect Immun.* 76(2):466-76

B

Baga, M. *et al.* (1987) Biogenesis of *E. coli* Pap pili : papH, aminoripilin subunit involved in cell anchoring and length modulation. *Cell* 49, 241- 251

Bagnoli F, Moschioni M, Donati C, Dimitrovska V, Ferlenghi I, Facciotti C, Muzzi A, Giusti F, Emolo C, Sinisi A, Hilleringmann M, Pansegrau W, Censini S, Rappuoli R, Covacci A, Masignani V, Barocchi MA. (2008) A second pilus type in *Streptococcus pneumoniae* is prevalent in emerging serotypes and mediates adhesion to host cells. *J Bacteriol.* Aug;190(15):5480-92.

Barocchi MA, Ries J, Zogaj X, Hemsley C, Albiger B, Kanth A, Dahlberg S, Fernebro J, Moschioni M, Masignani V, Hultenby K, Taddei AR, Beiter K, Wartha F, von Euler A, Covacci A, Holden DW, Normark S, Rappuoli R, Henriques-Normark B. (2006) A pneumococcal pilus influences virulence and host inflammatory responses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Feb 21;103(8):2857-62

Basset A, Turner KH, Boush E, Sayeed S, Dove SL, Malley R. (2011) Expression of the type 1 pneumococcal pilus is bistable and negatively regulated by the structural component RrgA. *Infect Immun.* May 16 -in press-

Bethe G, Nau R, Wellmer A *et al.* (2001) The cell wall-associated serine protease PrtA: a highly conserved virulence factor of *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Microbiol Lett*; 205: 99–104

Bentley ML, Gaweska H, Kielec JM, McCafferty DG. (2007) Engineering the substrate specificity of Staphylococcus aureus Sortase A. The beta6/beta7 loop from SrtB confers NPQTN recognition to SrtA. J Biol Chem. 282(9):6571-81

Birtalan SC, Phillips RM, Ghosh P. (2002) Three-dimensional secretion signals in chaperone-effector complexes of bacterial pathogens. Mol Cell. 9(5):971-80.

Blaylock B, Riordan KE, Missiakas DM, Schneewind O. (2006) Characterization of the Yersinia enterocolitica type III secretion ATPase YscN and its regulator, YscL. J Bacteriol. 188(10):3525-34.

Bleves S, Viarre V, Salacha R, Michel GP, Filloux A, Voulhoux R. (2010) Protein secretion systems in Pseudomonas aeruginosa: A wealth of pathogenic weapons. Int J Med Microbiol.;300(8):534-43.

Blocker AJ, Deane JE, Veenendaal AK, Roversi P, Hodgkinson JL, Johnson S, Lea SM. (2008) What's the point of the type III secretion system needle? Proc Natl Acad Sci U S A.;105(18):6507-13

Boucher RC. (2004) New concepts of the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. Eur Respir J. (1):146-58

Braun JS, Sublett JE, Freyer D, Mitchell TJ, Cleveland JL, Tuomanen EI, Weber JR. (2002) Pneumococcal pneumolysin and H₂O₂ mediate brain cell apoptosis during meningitis. J Clin Invest. Jan;109(1):19-27.

Burghout P, Beckers F, de Wit E, van Boxtel R, Cornelis GR, Tommassen J, Koster M. (2004) Role of the pilot protein YscW in the biogenesis of the YscC secretin in Yersinia enterocolitica. J Bacteriol. Aug;186(16):5366-75.

C

Chami M, Guilvout I, Gregorini M, Rémigy HW, Müller SA, Valerio M, Engel A, Pugsley AP, Bayan N. (2005) Structural insights into the secretin PulD and its trypsin-resistant core. J Biol Chem. Nov 11;280(45):37732-41.

Chatterjee C, Kumar S, Chakraborty S, Tan YW, Leung KY, Sivaraman J, Mok YK. (2011) Crystal structure of the heteromolecular chaperone, AscE-AscG, from the type III secretion system in Aeromonas hydrophila. PLoS One. 6(4):e19208.

Chorell E, Pinkner JS, Phan G, Edvinsson S, Buelens F, Remaut H, Waksman G, Hultgren SJ, Almqvist F. (2010) Design and synthesis of C-2 substituted thiazolo and dihydrothiazolo ring-fused 2-pyridones: pilicides with increased antivirulence activity. J Med Chem. 2010 Aug 12;53(15):5690-5.

Cockeran R, Steel HC, Mitchell TJ, Feldman C, Anderson R. (2001) Pneumolysin potentiates production of prostaglandin E₂ and leukotriene B₄ by human neutrophils. Infect Immun. May;69(5):3494-6.

Collaborative Computational Project, Number 4. (1994) The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 50(Pt 5):760-3.

Cornelis GR, Boland A, Boyd AP, Geuijen C, Iriarte M, Neyt C, Sory MP, Stainier I. (1998) The Virulence Plasmid of *Yersinia*, an Antihost Genome. *Microbiol, MolBiol Rev.* 62 :1315-52

Cornelis GR, Van Gijsegem F. (2000) Assembly and function of type III secretory systems. *Annu Rev Microbiol.* 2000;54:735-74. Review

Cornelis GR. (2006) The type III secretion injectisome. *Nat Rev Microbiol.* Nov;4(11):811-25. Review

Cowell BA, Evans DJ, Fleiszig SM. (2005) Actin cytoskeleton disruption by ExoY and its effects on *Pseudomonas aeruginosa* invasion. *FEMS Microbiol Lett.* 250(1):71-6.

Crago AM, Koronakis V. (1998) *Salmonella* InvG forms a ring-like multimer that requires the InvH lipoprotein for outer membrane localization. *Mol Microbiol.* Oct;30(1):47-56.

D

Dacheux D, Attree I, Toussaint B. (2001) Expression of ExsA in trans confers type III secretion system-dependent cytotoxicity on noncytotoxic *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolates. *Infect Immun.*;69(1):538-42.

Dasgupta N, Lykken GL, Wolfgang MC, Yahr TL. (2004) A novel anti-anti-activator mechanism regulates expression of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system. *Mol Microbiol.*;53(1):297-308

Diepold A, Amstutz M, Abel S, Sorg I, Jenal U, Cornelis GR. (2010) Deciphering the assembly of the *Yersinia* type III secretion injectisome. *EMBO J.*;29(11):1928-40

Dinwiddie R. (2005) Anti-inflammatory therapy in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros.*;4 Suppl 2:45-8

Dorléans F, Varon E, Lepoutre A, Georges S, Gutmann L, Lévy-Bruhl D *et al.*, (2010) Impact de la vaccination par le vaccin anti-pneumococcique conjugué heptavalent sur l'incidence des infections invasives à pneumocoque en France.

Dramsi S, Trieu-Cuot P, Bierne H. (2005) Sorting sortases: a nomenclature proposal for the various sortases of Gram-positive bacteria. *Res Microbiol.* Apr;156(3):289-97. Review

E

El-Mortaji L, Terrasse R, Dessen A, Vernet T, Di Guilmi AM. (2010) Stability and assembly of pilus subunits of *Streptococcus pneumoniae*. *J Biol Chem.* Apr 16;285(16):12405-15.

Emsley P, Cowtan K. (2004) Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 60(Pt 12 Pt 1):2126-32

Engel J, Balachandran P. (2009) Role of *Pseudomonas aeruginosa* type III effectors in disease. *Curr Opin Microbiol.* 2009 Feb;12(1):61-6

F

Fitzgerald TJ, Repesh LA.(1987) The hyaluronidase associated with *Treponema pallidum* facilitates treponemal dissemination. *Infect Immun* 55: 1023–1028.

Frank DW, Vallis A, Wiener-Kronish JP, Roy-Burman A, Spack EG, Mullaney BP, Megdoud M, Marks JD, Fritz R, Sawa T. (2002) Generation and characterization of a protective monoclonal antibody to *Pseudomonas aeruginosa* PcrV. *J Infect Dis.* 186(1):64-73.

Frank DW. (1997) The exoenzyme S regulon of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol.* 1997 Nov;26(4):621-9.

Fraylick JE, La Rocque JR, Vincent TS, Olson JC. (2001) Independent and coordinate effects of ADP-ribosyltransferase and GTPase-activating activities of exoenzyme S on HT-29 epithelial cell function. *Infect Immun*; 69(9):5318-28.

Friedland I, Gallagher G, King T, Woods GL. (2004) Antimicrobial susceptibility patterns in *Pseudomonas aeruginosa*: data from a multicenter Intensive Care Unit Surveillance Study (ISS) in the United States. *J Chemother.* Oct;16(5):437-41.

Fronzes R, Remaut H, Waksman G. (2008) Architectures and biogenesis of non-flagellar protein appendages in Gram-negative bacteria. *EMBO J.* 27(17):2271-80

G

Galán JE, Collmer A. (1999) Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science.* May 21;284(5418):1322-8. Review

Ganesh VK, Rivera JJ, Smeds E, Ko YP, Bowden MG, Wann ER, Gurusiddappa S, Fitzgerald JR, Höök M. (2008) A structural model of the *Staphylococcus aureus* ClfA-fibrinogen interaction opens new avenues for the design of anti-staphylococcal therapeutics. *PLoS Pathog.* (11):e1000226

Gianfaldoni C, Censini S, Hilleringmann M, Moschioni M, Facciotti C, Pansegrau W, Masignani V, Covacci A, Rappuoli R, Barocchi MA, Ruggiero P. (2007) *Streptococcus pneumoniae* pilus subunits protect mice against lethal challenge. *Infect Immun.* Feb;75(2):1059-62.

Golovanov AP, Balasingham S, Tzitzilonis C, Goult BT, Lian LY, Homberset H, Tønjum T, Derrick JP. (2006) The solution structure of a domain from the *Neisseria meningitidis* lipoprotein PilP reveals a new beta-sandwich fold. *J Mol Biol.* 364(2):186-95.

Goranson J, Hovey Ak, Frank DW. (1997) Functional analysis of *exsC* and *exsB* in regulation of exoenzyme S production by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* Mar ; 179(5) : 1646-54

Goure J, Pastor A, Faudry E, Chabert J, Dessen A, Attree I. (2004) The V antigen of *Pseudomonas aeruginosa* is required for assembly of the functional PopB/PopD translocation pore in host cell membranes. *Infect Immun.* 72(8):4741-50.

Gosink KK, Mann ER, Guglielmo C, Tuomanen EI, Masure HR. (2000) Role of novel choline binding proteins in virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun*; 68: 5690–5695.

Guilvout I, Chami M, Engel A, Pugsley AP, Bayan N. (2006) Bacterial outer membrane secretin PulD assembles and inserts into the inner membrane in the absence of its pilotin. *EMBO J.* 25 : 5241-5249

H

Hauser AR. (2009) The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection. *Nat Rev Microbiol.* Sep;7(9):654-65. Review

Hava DL, Camilli A. (2002) Large-scale identification of serotype 4 *Streptococcus pneumoniae* virulence factors. *Mol Microbiol.* Sep;45(5):1389-406.

Hendrickx AP, Budzik JM, Oh SY, Schneewind O. (2011) Architects at the bacterial surface - sortases and the assembly of pili with isopeptide bonds. *Nat Rev Microbiol.* Mar;9(3):166-76. Review

Hilleringmann M, Giusti F, Baudner BC, Maignani V, Covacci A, Rappuoli R, Barocchi MA, Ferlenghi I. (2008) Pneumococcal pili are composed of protofilaments exposing adhesive clusters of RrgA. *PLoS Pathog.* 2008 Mar 21;4(3):e1000026.

Hilleringmann M, Ringler P, Müller SA, De Angelis G, Rappuoli R, Ferlenghi I, Engel A. (2009) Molecular architecture of *Streptococcus pneumoniae* TIGR4 pili. *EMBO J.* Dec 16;28(24):3921-30.

Hirst RA, Gosai B, Rutman A, Guerin CJ, Nicotera P, Andrew PW, O'Callaghan C. (2008) *Streptococcus pneumoniae* deficient in pneumolysin or autolysin has reduced virulence in meningitis. *J Infect Dis.* Mar 1;197(5):744-51.

Hodgkinson JL, Horsley A, Stabat D, Simon M, Johnson S, da Fonseca PC, Morris EP, Wall JS, Lea SM, Blocker AJ. (2009) Three-dimensional reconstruction of the *Shigella* T3SS transmembrane regions reveals 12-fold symmetry and novel features throughout. *Nat Struct Mol Biol.* May;16(5):477-85.

Høiby N. (2006) Understanding bacterial biofilms in patients with cystic fibrosis: current and innovative approaches to potential therapies. *J Cyst Fibros.* (4):249-54.

Høiby N, Ciofu O, Johansen HK, Song ZJ, Moser C, Jensen PØ, Molin S, Givskov M, Tolker-Nielsen T, Bjarnsholt T. (2011a) The clinical impact of bacterial biofilms. *Int J Oral Sci.* (2):55-65.

Høiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O. (2011b) Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents.* (4):322-32

Hyams C, Yuste J, Bax K, Camberlein E, Weiser JN, Brown JS. (2010) Streptococcus pneumoniae resistance to complement-mediated immunity is dependent on the capsular serotype. Infect Immun. Feb;78(2):716-25.

I

Imada K, Minamino T, Tahara A, Namba K. (2007) Structural similarity between the flagellar type III ATPase FliI and F1-ATPase subunits. Proc Natl Acad Sci U S A. Jan 9;104(2):485-90

Izoré T, Job V, Dessen A. (2011) Biogenesis, regulation, and targeting of the type III secretion system. Structure. 19(5):603-12.

Izoré T, Contreras-Martel C, El Mortaji L, Manzano C, Terrasse R, Vernet T, Di Guilmi AM, Dessen A. (2010) Structural basis of host cell recognition by the pilus adhesin from Streptococcus pneumoniae. 18(1):106-15.

J

Jacobs MR, Koornhof HJ, Robins-Browne RM, Stevenson CM, Vermaak ZA, Freiman I, Miller GB, Witcomb MA, Isaacs M, Ward JI, Austrian R. (1978) Emergence of multiply resistant pneumococci. N Engl J Med. 299(14):735-40.

Jin F, Conrad JC, Gibiansky ML, Wong GC. (2011) Bacteria use type-IV pili to slingshot on surfaces. Proc Natl Acad Sci U S A.

Job V, Mattei PJ, Lemaire D, Attree I, Dessen A. (2010) Structural basis of chaperone recognition of type III secretion system minor translocator proteins. J Biol Chem. 285(30):23224-32.

Jones, C.H. et al. (1995) FimH adhesin of type 1 pili is assembled into a fibrillar tip structure in the Enterobacteriaceae. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 92, 2081–2085

K

Kang HJ, Coulibaly F, Proft T, Baker EN. (2011) Crystal structure of Spy0129, a Streptococcus pyogenes class B sortase involved in pilus assembly. PLoS One. 6(1):e15969.

Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, Buchwald M, Tsui LC. (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. Science. 198 Sep 8;245(4922):1073-80.

Kimbrough TG, Miller SI. (2000) Contribution of Salmonella typhimurium type III secretion components to needle complex formation. Proc Natl Acad Sci U S A. Sep 26;97(20):11008-13.

Kipnis E, Sawa T, Wiener-Kronish J. (2006) Targeting mechanisms of Pseudomonas aeruginosa pathogenesis. Med Mal Infect. Feb;36(2):78-91.

Kline KA, Dodson KW, Caparon MG, Hultgren SJ. (2010) A tale of two pili: assembly and function of pili in bacteria. *Trends Microbiol.*;18(5):224-32

Koebnik R. (2001) The role of bacterial pili in protein and DNA translocation. *Trends Microbiol.* Dec;9(12):586-90.

Konto-Ghiorgi Y, Mairey E, Mallet A, Duménil G, Caliot E, Trieu-Cuot P, Dramsi S. (2009) Dual role for pilus in adherence to epithelial cells and biofilm formation in *Streptococcus agalactiae*. *PLoS Pathog.* (5):e1000422

Koo J, Tammam S, Ku SY, Sampaleanu LM, Burrows LL, Howell PL. (2008) PilF is an outer membrane lipoprotein required for multimerization and localization of the *Pseudomonas aeruginosa* Type IV pilus secretin. *J Bacteriol.* 190(21):6961-9.

Korotkov KV, Pardon E, Steyaert J, Hol WG. (2009) *Structure.* Feb 13;17(2):255-65. Crystal structure of the N-terminal domain of the secretin GspD from ETEC determined with the assistance of a nanobody.

Korotkov KV, Gonen T, Hol WG. (2011) Secretins: dynamic channels for protein transport across membranes. *Trends Biochem Sci.* May 10 -in press-

Kreikemeyer B, Gámez G, Margarit I, Giard JC, Hammerschmidt S, Hartke A, Podbielski A. (2011) Genomic organization, structure, regulation and pathogenic role of pilus constituents in major pathogenic *Streptococci* and *Enterococci*. *Int J Med Microbiol.* Mar;301(3):240-51. Epub 2010 Nov 26. Review

Krishnan V, Narayana SV. (2011) Crystallography of gram-positive bacterial adhesins. *Adv Exp Med Biol.* 715:175-95

Krishnan V, Gaspar AH, Ye N, Mandlik A, Ton-That H, Narayana SV. (2007) An IgG-like domain in the minor pilin GBS52 of *Streptococcus agalactiae* mediates lung epithelial cell adhesion. *Structure* (8):893-903.

Kubori T, Matsushima Y, Nakamura D, Uralil J, Lara-Tejero M, Sukhan A, Galán JE, Aizawa SI. (1998) Supramolecular structure of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Science.* Apr 24;280(5363):602-5.

L

Lara-Tejero M, Kato J, Wagner S, Liu X, Galán JE. (2011) A sorting platform determines the order of protein secretion in bacterial type III systems. *Science.* 331(6021):1188-91.

Lario PI, Pfuetzner RA, Frey EA, Creagh L, Haynes C, Maurelli AT, Strynadka NC. (2005) Structure and biochemical analysis of a secretin pilot protein. *EMBO J.* 24(6):1111-21.

Lavander M, Sundberg L, Edqvist PJ, Lloyd SA, Wolf-Watz H, Forsberg A. (2002) Proteolytic cleavage of the FlhB homologue YscU of *Yersinia pseudotuberculosis* is essential for bacterial survival but not for type III secretion. *J Bacteriol.*;184(16):4500-9

LeMieux J, Hava DL, Basset A, Camilli A. (2006) RrgA and RrgB are components of a multisubunit pilus encoded by the *Streptococcus pneumoniae* rlrA pathogenicity islet. *Infect Immun.* Apr;74(4):2453-6.

Lepoutre A, Varon E, Georges S, Gutmann L, Lévy-Bruhl D. (2008) Impact of infant pneumococcal vaccination on invasive pneumococcal diseases in France, 2001-2006. *Euro Surveill.* Aug 28;13(35).

Lilic M, Vujanac M, Stebbins CE. (2006) A common structural motif in the binding of virulence factors to bacterial secretion chaperones. *Mol Cell.* 21(5):653-64

Lindberg F et al. (1987) Localization of the receptor-binding protein adhesin at the tip of the bacterial pilus. *Nature* 328, 84–87

Lokanath NK, Matsuura Y, Kuroishi C, Takahashi N, Kunishima N. (2007) Dimeric core structure of modular stator subunit E of archaeal H⁺-ATPase. *J Mol Biol.* 366(3):933-44.

Lunelli M, Lokareddy RK, Zychlinsky A, Kolbe M. (2009) IpaB-IpgC interaction defines binding motif for type III secretion translocator. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106(24):9661-6.

Lyczak JB, Cannon CL, Pier GB. (2000) Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. *Microbes Infect.* Jul;2(9):1051-60. Review

M

McCaw ML, Lykken GL, Singh PK, Yahr TL. (2002) ExsD is a negative regulator of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion regulon. *Mol Microbiol.*;46(4):1123-33.

McCoy AJ, Grosse-Kunstleve RW, Adams PD, Winn MD, Storoni LC, Read RJ. (2007) Phaser crystallographic software. *J Appl Crystallogr.* 40(Pt 4):658-674.

Macleod CM, Hodges RG, Heidelberger M, Bernhard WG. (1945) Prevention of pneumococcal pneumonia by immunization with specific capsular polysaccharides. *J Exp Med.* Nov 30;82(6):445-65.

Mandlik A, Swierczynski A, Das A, Ton-That H. (2008) Pili in Gram-positive bacteria: assembly, involvement in colonization and biofilm development. *Trends Microbiol.* 16(1):33-40

Manzano C, Contreras-Martel C, El Mortaji L, Izoré T, Fenel D, Vernet T, Schoehn G, Di Guilmi AM, Dessen A. (2008) Sortase-mediated pilus fiber biogenesis in *Streptococcus pneumoniae*. *Structure.* Dec 10;16(12):1838-48.

Manzano C, Izoré T, Job V, Di Guilmi AM, Dessen A. (2009) Sortase activity is controlled by a flexible lid in the pilus biogenesis mechanism of gram-positive pathogens. *Biochemistry.* Nov 10;48(44):10549-57.

Maresso AW, Schneewind O. (2008) Sortase as a target of anti-infective therapy. *Pharmacol Rev.*;60(1):128-41.

Marlovits TC, Kubori T, Lara-Tejero M, Thomas D, Unger VM, Galán JE. (2006) Assembly of the inner rod determines needle length in the type III secretion injectisome. *Nature*. Jun 1;441(7093):637-40.

Matthews BW. (1968) Solvent content of protein crystals. *J Mol Biol* ;33(2):491-7

Matteï PJ, Faudry E, Job V, Izoré T, Attree I, Dessen A. (2011) Membrane targeting and pore formation by the type III secretion system translocon. *FEBS J*. Feb;278(3):414-26.

Mazmanian SK, Liu G, Ton-That H, Schneewind O. (1999) Staphylococcus aureus sortase, an enzyme that anchors surface proteins to the cell wall. *Science* ;285(5428):760-3

Minamino T, MacNab RM. (2000) FliH, a soluble component of the type III flagellar export apparatus of Salmonella, forms a complex with FliI and inhibits its ATPase activity. *Mol Microbiol*. 37(6):1494-503.

Minamino T, Yoshimura SD, Morimoto YV, González-Pedrajo B, Kami-Ike N, Namba K. (2009) Roles of the extreme N-terminal region of FliH for efficient localization of the FliH-FliI complex to the bacterial flagellar type III export apparatus. *Mol Microbiol*. 74(6):1471-83

Mitchell TJ, Andrew PW, Saunders FK, Smith AN, Boulnois GJ. (1991) Complement activation and antibody binding by pneumolysin via a region of the toxin homologous to a human acute-phase protein. *Mol Microbiol*. Aug;5(8):1883-8.

Mitchell AM, Mitchell TJ. (2010) Streptococcus pneumoniae: virulence factors and variation. *Clin Microbiol Infect*. May;16(5):411-8

Moschioni M, Emolo C, Biagini M, Maccari S, Pansegrau W, Donati C, Hillerigmann M, Ferlenghi I, Ruggiero P, Sinisi A, Pizza M, Norais N, Barocchi MA, Masignani V. (2010) The two variants of the Streptococcus pneumoniae pilus 1 RrgA adhesin retain the same function and elicit cross-protection in vivo. *Infect Immun* Dec;78(12):5033-42.

Moore MR, Gertz RE Jr, Woodbury RL, Barkocy-Gallagher GA, Schaffner W, Lexau C, Gershman K, Reingold A, Farley M, Harrison LH, Hadler JL, Bennett NM, Thomas AR, McGee L, Pilishvili T, Brueggemann AB, Whitney CG, Jorgensen JH, Beall B. (2008) Population snapshot of emergent Streptococcus pneumoniae serotype 19A in the United States, 2005. *J Infect Dis*. Apr 1;197(7):1016-27.

Müller SA, Pozidis C, Stone R, Meesters C, Chami M, Engel A, Economou A, Stahlberg H. (2006) Double hexameric ring assembly of the type III protein translocase ATPase HrcN. *Mol Microbiol*. 61(1):119-25.

Murshudov GN, Vagin AA, Dodson EJ. (1997) Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 53(Pt 3):240-55.

N

Nakano N, Kubori T, Kinoshita M, Imada K, Nagai H. (2010) Crystal structure of Legionella DotD: insights into the relationship between type IVB and type II/III secretion systems. *PLoS Pathog*. Oct 7;6(10).

Neiers F, Madhurantakam C, Fälker S, Manzano C, Dessen A, Normark S, Henriques-Normark B, Achour A. (2009) Two crystal structures of pneumococcal pilus sortase C provide novel insights into catalysis and substrate specificity. *J Mol Biol.* 393(3):704-16

Nelson AL, Roche AM, Gould JM, Chim K, Ratner AJ, Weiser JN. (2007a) Capsule enhances pneumococcal colonization by limiting mucus-mediated clearance. *Infect Immun* 2007; 75: 83–90

Nelson AL, Ries J, Bagnoli F, Dahlberg S, Fälker S, Rounioja S, Tschöp J, Morfeldt E, Ferlenghi I, Hilleringmann M, Holden DW, Rappuoli R, Normark S, Barocchi MA, Henriques-Normark B. (2007) RrgA is a pilus-associated adhesin in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol.* Oct;66(2):329-40.

Nishihara K, Kanemori M, Kitagawa M, Yanagi H, Yura T. (1998) Chaperone coexpression plasmids: differential and synergistic roles of DnaK-DnaJ-GrpE and GroEL-GroES in assisting folding of an allergen of Japanese cedar pollen, Cryj2, in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.* 64(5):1694-9.

O

Okon M, Moraes TF, Lario PI, Creagh AL, Haynes CA, Strynadka NC, McIntosh LP. (2008) Structural characterization of the type-III pilot-secretin complex from *Shigella flexneri*. *Structure.* Oct 8;16(10):1544-54.

Ottmann C, Yasmin L, Weyand M, Veessenmeyer JL, Diaz MH, Palmer RH, Francis MS, Hauser AR, Wittinghofer A, Hallberg B. (2007) Phosphorylation-independent interaction between 14-3-3 and exoenzyme S: from structure to pathogenesis. *EMBO J.* 26(3):902-13

P

Pallen MJ, Bailey CM, Beatson SA. (2006) Evolutionary links between FliH/YscL-like proteins from bacterial type III secretion systems and second-stalk components of the FoF1 and vacuolar ATPases. *Protein Sci.* 15(4):935-41.

Park IH, Pritchard DG, Cartee R, Brandao A, Brandileone MC, Nahm MH. (2007) Discovery of a new capsular serotype (6C) within serogroup 6 of *Streptococcus pneumoniae*. *J Clin Microbiol.* Apr;45(4):1225-33.

Parsot C, Hamiaux C, Page AL. (2003) The various and varying roles of specific chaperones in type III secretion systems. *Curr Opin Microbiol.* 6(1):7-14. Review

Pastor A, Chabert J, Louwagie M, Garin J, Attree I. (2005) PscF is a major component of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion needle. *FEMS Microbiol Lett.* 253(1):95-101

Paterson NG, Baker EN. (2011) Structure of the Full-Length Major Pilin from *Streptococcus pneumoniae*: Implications for Isopeptide Bond Formation in Gram-Positive Bacterial Pili. *PLoS One* ;6(7):e22095.

Paton JC, Ferrante A. (1983) Inhibition of human polymorphonuclear leukocyte respiratory burst, bactericidal activity, and migration by pneumolysin. *Infect Immun.* Sep;41(3):1212-6.

Pederson KJ, Vallis AJ, Aktories K, Frank DW, Barbieri JT. (1999) The amino-terminal domain of *Pseudomonas aeruginosa* ExoS disrupts actin filaments via small-molecular-weight GTP-binding proteins. *Mol Microbiol.* 32(2):393-401.

Phillips K, de la Peña AH. (2011) The combined use of the ThermoFluor assay and ThermoQ analytical software for the determination of protein stability and buffer optimization as an aid in protein crystallization. *Curr Protoc Mol Biol.* 2011 Apr;Chapter 10:Unit10.28.

Pointon JA, Smith WD, Saalbach G, Crow A, Kehoe MA, Banfield MJ. (2010) A highly unusual thioester bond in a pilus adhesin is required for efficient host cell interaction. *J Biol Chem.* 285(44):33858-66

Pozidis C, Chalkiadaki A, Gomez-Serrano A, Stahlberg H, Brown I, Tampakaki AP, Lustig A, Sianidis G, Politou AS, Engel A, Panopoulos NJ, Mansfield J, Pugsley AP, Karamanou S, Economou A. (2003) Type III protein translocase: HrcN is a peripheral ATPase that is activated by oligomerization. *J Biol Chem.* 278(28):25816-24.

Poyraz O, Schmidt H, Seidel K, Delissen F, Ader C, Tenenboim H, Goosmann C, Laube B, Thünemann AF, Zychlinsky A, Baldus M, Lange A, Griesinger C, Kolbe M. (2010) Protein refolding is required for assembly of the type three secretion needle. *Nat Struct Mol Biol.* Jul;17(7):788-92

Q

Quinaud M, Chabert J, Faudry E, Neumann E, Lemaire D, Pastor A, Elsen S, Dessen A, Attree I. (2005) The PscE-PscF-PscG complex controls type III secretion needle biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem.* 280(43):36293-300.

Quinaud M, Plé S, Job V, Contreras-Martel C, Simorre JP, Attree I, Dessen A. (2007) Structure of the heterotrimeric complex that regulates type III secretion needle formation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104(19):7803-8.

R

Romijn RA, Bouma B, Wuyster W, Gros P, Kroon J, Sixma JJ, Huizinga EG. (2001) Identification of the collagen-binding site of the von Willebrand factor A3-domain. *J Biol Chem.* Mar 30;276(13):9985-91

S

Sato H, Feix JB, Frank DW. (2006) Identification of superoxide dismutase as a cofactor for the *pseudomonas* type III toxin, ExoU. *Biochemistry.* 45(34):10368-75.

Schneewind O, Model P, Fischetti VA. (1992) Sorting of protein A to the staphylococcal cell wall. *Cell.* Jul 24;70(2):267-81.

- Schoehn G**, Di Guilmi AM, Lemaire D, Attree I, Weissenhorn W, Dessen A. (2003) Oligomerization of type III secretion proteins PopB and PopD precedes pore formation in *Pseudomonas*. *EMBO J.*; 22(19):4957-67.
- Schraidt O**, Lefebvre MD, Brunner MJ, Schmied WH, Schmidt A, Radics J, Mechtler K, Galán JE, Marlovits TC. (2010) Topology and organization of the *Salmonella typhimurium* type III secretion needle complex components. *PLoS Pathog.* 2010 Apr 1;6(4):e1000824.
- Schraidt O**, Marlovits TC. (2011) Three-dimensional model of *Salmonella*'s needle complex at subnanometer resolution. *Science.* 2011;331(6021):1192-5
- Schuch R**, Maurelli AT. (1999) The mxi-Spa type III secretory pathway of *Shigella flexneri* requires an outer membrane lipoprotein, MxiM, for invasin translocation. *Infect Immun.* Apr;67(4):1982-91.
- Schuch R**, Maurelli AT. (2001) MxiM and MxiJ, base elements of the Mxi-Spa type III secretion system of *Shigella*, interact with and stabilize the MxiD secretin in the cell envelope. *J Bacteriol.* Dec;183(24):6991-8.
- Sitkiewicz I**, Stockbauer KE, Musser JM. (2007) Secreted bacterial phospholipase A2 enzymes: better living through phospholipolysis. *Trends Microbiol.* 15(2):63-9
- Sorg I**, Wagner S, Amstutz M, Müller SA, Broz P, Lussi Y, Engel A, Cornelis GR. (2007) YscU recognizes translocators as export substrates of the *Yersinia* injectisome. *EMBO J.* 26(12):3015-24.
- Spreter T**, Yip CK, Sanowar S, André I, Kimbrough TG, Vuckovic M, Pfuetzner RA, Deng W, Yu AC, Finlay BB, Baker D, Miller SI, Strynadka NC. (2009) A conserved structural motif mediates formation of the periplasmic rings in the type III secretion system. *Nat Struct Mol Biol.* May;16(5):468-76.
- Stebbins CE**, Galán JE. (2001) Maintenance of an unfolded polypeptide by a cognate chaperone in bacterial type III secretion. *Nature.* 414(6859):77-81.
- Stover CK**, Pham XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warrenner P, Hickey MJ, Brinkman FS, Hufnagle WO, Kowalik DJ, Lagrou M, Garber RL, Goltry L, Tolentino E, Westbrook-Wadman S, *et al.* (2000) Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature.* Aug 31;406(6799):959-64.
- Stirling FR**, Cuzick A, Kelly SM, Oxley D, Evans TJ. (2006) Eukaryotic localization, activation and ubiquitinylation of a bacterial type III secreted toxin. *Cell Microbiol.* 8(8):1294-309.
- Sun P**, Tropea JE, Austin BP, Cherry S, Waugh DS. (2008) Structural characterization of the *Yersinia pestis* type III secretion system needle protein YscF in complex with its heterodimeric chaperone YscE/YscG. *J Mol Biol.* 377(3):819-30.
- Swietnicki W**, Carmany D, Retford M, Guelta M, Dorsey R, Bozue J, Lee MS, Olson MA. (2011) Identification of Small-Molecule Inhibitors of *Yersinia pestis* Type III Secretion System YscN ATPase. *PLoS One.* 6(5):e19716.

T

Telford JL, Barocchi MA, Margarit I, Rappuoli R, Grandi G. (2006) Pili in gram-positive pathogens. *Nat Rev Microbiol.* 2006 Jul;4(7):509-19. Review

Thibault J, Faudry E, Ebel C, Attree I, Elsen S. (2009) Anti-activator ExsD forms a 1:1 complex with ExsA to inhibit transcription of type III secretion operons. *J Biol Chem.*;284(23):15762-70

Tilley SJ, Orlova EV, Gilbert RJ, Andrew PW, Saibil HR. (2005) Structural basis of pore formation by the bacterial toxin pneumolysin. *Cell.* Apr 22;121(2):247-56.

Tomás M, Doumith M, Warner M, Turton JF, Beceiro A, Bou G, Livermore DM, Woodford N. (2010) Efflux pumps, OprD porin, AmpC beta-lactamase, and multiresistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *Antimicrob Agents Chemother.* May;54(5):2219-24.

Ton-That H, Schneewind O. (2003) Assembly of pili on the surface of *Corynebacterium diphtheriae*. *Mol Microbiol.* Nov;50(4):1429-38.

Ton-That H, Marraffini LA, Schneewind O. (2004) Sortases and pilin elements involved in pilus assembly of *Corynebacterium diphtheriae*. *Mol Microbiol.* Jul;53(1):251-61.

Tolker-Nielsen T, Høiby N. (2009) Extracellular DNA and F-actin as targets in antibiofilm cystic fibrosis therapy. *Future Microbiol.* (6):645-7.

Trappetti C, Kadioglu A, Carter M et al. (2009) Sialic acid: a preventable signal for pneumococcal biofilm formation, colonization, and invasion of the host. *J Infect Dis*; 199: 1497–1505.

Trindade MB, Job V, Contreras-Martel C, Pelicic V, Dessen A. (2008) Structure of a widely conserved type IV pilus biogenesis factor that affects the stability of secretin multimers. *J Mol Biol.* May 16;378(5):1031-9.

Trost B, Moore SA. (2009) Statistical characterization of the GxxxG glycine repeats in the flagellar biosynthesis protein FliH and its Type III secretion homologue YscL. *BMC Microbiol.* 9:72.

V

Van der Poll T, Opal SM. (2009) Pathogenesis, treatment, and prevention of pneumococcal pneumonia. *Lancet* 2009; 374: 1543–1556.

de Vrankrijker AM, Wolfs TF, van der Ent CK. (2010) Challenging and emerging pathogens in cystic fibrosis. *Paediatr Respir Rev.* (4):246-54.

Verger D, Bullitt E, Hultgren SJ, Waksman G. (2007) Crystal structure of the P pilus rod subunit PapA. *PLoS Pathog* ;3(5):e73.

Viarre V, Cascales E, Ball G, Michel GP, Filloux A, Voulhoux R. (2009) HxcQ liposecretin is self-piloted to the outer membrane by its N-terminal lipid anchor. *J Biol Chem.* Dec 4;284(49):33815-23.

Vogelaar NJ, Jing X, Robinson HH, Schubot FD. (2010) Analysis of the crystal structure of the ExsC.ExsE complex reveals distinctive binding interactions of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion chaperone ExsC with ExsE and ExsD. *Biochemistry.*;49(28):5870-9.

W

Walker JE, Saraste M, Runswick MJ, Gay NJ. (1982) Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.* 1(8):945-51.

Wang H, Oster G. (1998) Energy transduction in the F1 motor of ATP synthase. *Nature.* 396(6708):279-82.

Watson DA, Musher DM. (1990) Interruption of capsule production in *Streptococcus pneumoniae* serotype 3 by insertion of transposon Tn916. *Infect Immun.* Sep;58(9):3135-8.

Weiser JN. (2010) The pneumococcus: why a commensal misbehaves *J Mol Med (Berl).* 88(2):97-102.

Wolfgang MC, Kulasekara BR, Liang X, Boyd D, Wu K, Yang Q, Miyada CG, Lory S. (2003) Conservation of genome content and virulence determinants among clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jul 8;100(14):8484-9.

Y

Yahr TL, Wolfgang MC. (2006) Transcriptional regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system. *Mol Microbiol.*;62(3):631-40

Yanagawa R, Otsuki K, Tokui T. (1968) Electron microscopy of fine structure of *Corynebacterium renale* with special reference to pili. *Jpn J Vet Res.* 16(1):31-7

Z

Zarivach R, Vuckovic M, Deng W, Finlay BB, Strynadka NC. (2007) Structural analysis of a prototypical ATPase from the type III secretion system. *Nat Struct Mol Biol.* 14(2):131-7.

Zarivach R, Deng W, Vuckovic M, Felise HB, Nguyen HV, Miller SI, Finlay BB, Strynadka NC. (2008) Structural analysis of the essential self-cleaving type III secretion proteins EscU and SpaS *Nature* ;453(7191):124-7.

Références bibliographiques

Zong Y, Bice TW, Ton-That H, Schneewind O, Narayana SV. (2004a) Crystal structures of *Staphylococcus aureus* sortase A and its substrate complex. *J Biol Chem*. 2004 Jul 23;279(30):31383-9.

Zong Y, Mazmanian SK, Schneewind O, Narayana SV. (2004b) The structure of sortase B, a cysteine transpeptidase that tethers surface protein to the *Staphylococcus aureus* cell wall. *Structure*. 2004 Jan;12(1):105-12.

Zong Y, Xu Y, Liang X, Keene DR, Höök A, Gurusiddappa S, Höök M, Narayana SV. (2005) A 'Collagen Hug' model for *Staphylococcus aureus* CNA binding to collagen. *EMBO J*. Dec 21;24(24):4224-36.